

PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

J. BRACHET
BRUXELLES

N. KAMIYA
OSAKA

A. PISCHINGER
WIEN

S. STRUGGER
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK
ROSTOCK

FRIEDL WEBER
GRAZ

KARL HÖFLER
WIEN

BAND LI, HEFT 1

MIT 98 TEXTABBILDUNGEN UND 22 FARBIGEN ABBILDUNGEN AUF 2 TAFELN
ABGESCHLOSSEN AM 16. APRIL 1959



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1959

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut, Graz, Schubertstraße 51, Österreich, oder

Prof. Dr. J. Speck, Zoologisches Institut, (3a) Rostock, Universitätsplatz, DDR, oder

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich oder

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mülkerbastei 5

Fernsprecher: 63 96 14 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Besitzer der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1 1/2 Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

LI. Band

Inhaltsverzeichnis

1. Heft

Abhandlungen

Seite

Seeger, P. G. und W. Schacht: Untersuchungen am Ehrlichschen Ascitescarcinom der Maus (III. Mitt.)	1
Lamina, J.: Untersuchungen über den Einfluß der Ultrazentrifugierung auf den Bewegungs-, Teilungs- und Entwicklungsrythmus des Eies von <i>Parascaris equorum</i> (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilmes	14
Krisai-Knyrim, Dietlinde: Untersuchungen über Plasmakonfiguration und Vitalfärbbarkeit von Hyphen aus Basidiomyceten-Fruchtkörpern	66
Lindner, Hildegard: Die lichtabhängige Vakuolisierung der Chloroplasten in Nikotinlösungen. I. Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Frage der Reversibilität	91
Linser, H. und O. Kiermayer: Die Wirksamkeit verschiedener Wuchs- und Hemmstoffe in gepufferten Lanolinpasten verschiedener Wasserstoffionenkonzentration	112
Nakazawa, S.: Developmental Mechanics of Fucaceous Algae XII. Further Studies on the Blister Formation in Fucoid Eggs	123

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

Aus der Universitäts-Hautklinik der Humboldt-Universität (Charité) Berlin
Direktor Prof. Dr. K. Linser
Histochemische Abtlg.: Abtlg.-Leiter Oberarzt Dr. sc. nat., Dr. med. P. G. Seeger
Zellphysiologische Abtlg.: Prof. Dr. F. Windisch

Untersuchungen am Ehrlichschen Ascitescarcinom der Maus¹

III. Mitt.: Die Trypanblaufärbung von Tumorzellen als Kriterium der Mortalität

(Eine Erwiderung auf die Arbeit von W. Thumm: Kann Trypanblau-
speicherung zur Bestimmung der Vitalität von Tumorzellen dienen?)

Von

P. G. Seeger* und W. Schacht

Mit 22 farbigen Abbildungen auf 2 Tafeln

(Eingegangen am 28. Februar 1958)

Seit den Untersuchungen von A. Wentzlaff (1924) über die Vitalfärbung an Froschlungen ist bekannt, daß der saure Vitalfarbstoff Trypanblau wegen seiner Grobdispersität nur in geschädigte bzw. abgestorbene Zellen permeieren kann. Der eine von uns (Seeger) konnte 1931 feststellen, daß nur die Leydigischen Zellen der sich ablösenden oder abgelösten Urodelenhaut, d. h. nur die geschädigten oder toten Leydigischen Zellen, sich durch Trypanblau färben lassen. 1936/37 konnte P. G. Seeger an den Tumorzellen des Ehrlichschen Ascitescarcinoms beobachten, daß Trypanblau nur die Kernkörperchen bzw. die Kerne einzelner Typus-II-Zellen, diejenigen der Vakuolenzellen (Typus III) samt Vakuole und die Zellen vom Typus IV in toto tingiert. Diese Feststellungen konnten kürzlich farbenphotographisch bestätigt werden (P. G. Seeger und W. Schacht 1958). In Ergänzung dazu können Befunde von L. J. Ludford zitiert werden, der 1929 mitteilte, daß Trypanblau Tumorzellen nicht direkt anfärbt, daß jedoch die Außenzonen von Tumoren (nekrotische Partien) gefärbt werden.

Auf Grund der beschriebenen spezifischen vitalfärberischen Eigenschaften des Trypanblaus benutzten E. Haagen und P. G. Seeger 1938 diesen

¹ Die Untersuchungen wurden im Rahmen eines Forschungsauftrages des Staatssekretariats für Hochschulwesen durchgeführt.

* Herrn Heinrich Steffens, Hamburg-Wandsbek gewidmet.

Farbstoff in vitro als Kriterium für die Anzahl geschädigter bzw. abgestorbener Tumorasciteszellen bei der Verimpfung nach Einwirkung bestimmter Temperaturen in bestimmten Zeiteinheiten. Es ergab sich, daß die Virulenz der nach Einwirkung verschiedener Temperaturen transplantierten Tumorasciteszellen der Zunahme mit Trypanblau färbbarer Tumorasciteszellen umgekehrt proportional ist. Am meisten leidet die Virulenz bei einer Aufbewahrung des Ascites bei 37° C, nach 24 Stunden werden etwa 95–99 Prozent der Zellen durch Trypanblau tingiert, d. h. sind geschädigt bzw. tot.

1954 unternahm W. Thumm Versuche in dieser Richtung und gelangte zu ähnlichen Ergebnissen. Thumm folgerte hieraus: „Wenn die Färbbarkeit mit Trypanblau als Indikator einer Avirulenz angesehen werden könnte, so müßte sich hierauf eine technisch einfache Methode aufbauen lassen, um direkte zelltötende Wirkungen chemischer Faktoren in vitro zu bestimmen.“ Er untersuchte daher die Wirkungen von N-Lost (Dichlorethyläther) und anderen Stoffen auf die Färbbarkeit der Zellen des Mäuseascitestumors durch Trypanblau, indem er den Ascitestumor mit gleichen Teilen Ringerlösung oder Lösungen von N-Lost in Ringerlösung gemischt, so daß die Endkonzentrationen 50, 100, 150, 250 und 500 γ /ml betrugen, bei 37° C bebrütete, nach 1, 2 und 3 Stunden Proben dieser Mischungen mit Trypanblau färbte und die gefärbten Zellen zählte. Thumm fand keinen Unterschied in der Prozentzahl trypanblaugefärbter unbehandelter Tumorasciteszellen gegenüber mit N-Lost behandelten Tumorasciteszellen.

Nach i. p. Verimpfung von 0,2 ml einer Suspension von Tumorasciteszellen, die nach Zusatz von 50, 100, 150, 250 und 500 γ /ml N-Lost drei Stunden bei 37° C bebrütet und dreimal in der Zentrifuge mit Ringerlösung gewaschen worden waren, ergab sich gegenüber unbehandelten Tumorasciteszellen bis zu 30 Tagen keine Tumorentwicklung. Eine zweistündige Einwirkung von 50 bzw. 100 γ /ml Sinalost bei 37° C führte ebenfalls zu einem weitgehenden Verlust der Virulenz. Selbst nach Einwirkung von 250 γ /ml Sinalost fand Thumm keine Steigerung der Zahl mit Trypanblau färbbarer Zellen und folgert daraus, daß die Trypanblauspeicherung nicht als Indikator einer durch chemische Faktoren erzeugten Avirulenz von Tumorzellen verwendet werden kann, sondern nur der Transplantationsversuch diese Frage zu beantworten vermag.

Zur Klärung der Diskrepanz der Trypanblauspeicherung in unbehandelten und N-Lost behandelten Tumorasciteszellen unternahmen wir deshalb folgende Versuche:

- Ia) Je 0,2 ml frisch entnommener Tumorascites wurde steril i. p. auf 10 Mäuse verimpft, innerhalb von 10 Tagen hatte sich das Tumorascitescarcinom soweit entwickelt, daß die Mäuse kurz vor dem Exitus standen. Nach Färbung verschiedener Proben mit einer Lösung von Trypanblau: Ringer = 1 : 5000 traten nur wenige blaßblau gefärbte Zellen in Erscheinung (Abb. 1).
- Ib) Wird der Tumorascites 1 Stunde lang bei 45° C abgetötet, so ergeben etwa 80% der Zellen eine intensive Blaufärbung, die restlichen 20% färben sich erst nach einer Färbedauer von 5–10 Minuten blaßbläulich

(Abb. 2). Wird der Tumorasцитes 1 Stunde lang bei 55° C abgetötet, so färben sich mehr als 90% der Zellen dunkelblau, der Rest erscheint blaßblau (Abb. 3).

Wird Ascites mit Lost und Trypanblau sofort gemischt, so sind in dem Gemisch nur wenige gefärbte Zellen festzustellen (Abb. 4 und 5). Das Zentrum der hell leuchtenden Granula erscheint rot (Mitochondrienrest).

II a) 1. Den Tieren der Versuchsserie Ia) wurde Ascites steril entnommen; fünf sterilisierte Röhrchen wurden beschickt mit je 1 ml einer Suspension von 0,2 ml Ascites und 0,8 ml Ringerlösung, den Röhrchen wurden steigende Mengen von Methyl-bis- β -chloräthylaminchlorhydrat (Stickstofflost „Ebewe“) zugesetzt, und zwar Röhrchen Nr. 1 (R_I) = 0,02 ml = 50 γ ; R_{II} 0,04 ml = 100 γ ; R_{III} 0,06 ml = 150 γ ; R_{IV} 0,1 ml = 250 γ ; R_V 0,2 ml = 500 γ Stickstofflost.

Die Röhrchen I bis V wurden 3 Stunden lang bei 37° C bebrütet. Nach 3 Stunden ergab sich folgender Befund: Bei einer N-Lost-Konzentration von 50 γ sind etwa 20–30% der Zellen blaßblau gefärbt (Abb. 6), mit steigender Lostkonzentration nimmt die Trypanblaufärbbarkeit ab, so daß bei einer Konzentration von 500 γ Stickstofflost nur noch vereinzelte blaue Zellen sichtbar sind (Abb. 7).

Nach einer Bebrütung von 18 Stunden bei 37° C sind in R_I (Konzentration 50 γ N-Lost) alle Zellen total gefärbt (Abb. 8), ebenso in R_{II} (Konzentration 100 γ N-Lost); in R_V (Konzentration 500 γ N-Lost) erscheinen nach 18 Stunden höchstens 20% der Zellen blau gefärbt (Abb. 9).

II a) 2. Bei einem Parallelversuch wurde statt N-Lost Sinalost (Trichlortriäthylamin-chlorhydrat + Zitronensäure) der Nordmarkwerke verwendet.

Nach dreistündiger Bebrütung bei 37° C ist der Befund derselbe wie bei N-Lost. R_{VI} mit 50 γ Sinalost enthält etwa 15–20% blaßblau gefärbte Zellen (Abb. 10); R_{IX} mit einer Konzentration von 250 γ Sinalost weist etwa 50% blaue Zellen auf (Abb. 11). Nach einer 18stündigen Bebrütung bei 37° C zeigen die Röhrchen mit den niedrigen Sinalostkonzentrationen von 50 und 100 γ eine totale Dunkelblaufärbung (Abb. 12), R_{IX} mit der Konzentration von 250 γ (Abb. 13) enthält ebenso wie R_X mit 500 γ nur sehr wenige (etwa 20%) intensiv blau und blaßblau gefärbte Zellen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Es bedeuten: (++++) dunkelblaue Totalfärbung der Zellen, (+++) etwa 50% der Zellen gefärbt, (++) etwa 20% der Zellen gefärbt, (+) einzelne Zellen gefärbt, (–+) ganz vereinzelt eine Zelle gefärbt, der übrige größte Teil ungefärbt.

Die Beobachtung, daß mit steigender Konzentration an N-Lost oder Sinalost die Färbbarkeit der Tumorasцитезellen mit Trypanblau schlechter wird, obwohl die Zellen nach dem Ergebnis der Transplantation zu urteilen nicht angehen, also geschädigt bzw. tot sein müssen, veranlaßte uns, den N-Lost bzw. Sinalost durch Waschen mit Ringerlösung wieder aus den Zellen zu entfernen.

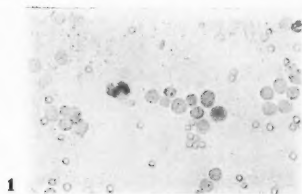
Werden zu 0,2 ml Tumorasцитes in 0,8 ml Ringerlösung 500 γ N-Lost + 0,5 ml Trypanblaulösung 1 : 5000 oder 500 γ Sinalost + 0,5 ml Trypanblau-

lösung zugesetzt, so sind sowohl nach einer dreistündigen als auch 18stündigen Bebrütung bei 37° C nur etwa 1% der Zellen blau gefärbt. Durch Zusatz von einem Tropfen $n/10$ HCl, $n/10$ NaOH in 96prozentigem Alkohol, $n/10$ NH_3 und $n/10$ ammoniakalischem 96prozentigem Alkohol ist keine Änderung der Färbbarkeit mit Trypanblau zu erzielen. Werden jedoch die mit N-Lost bzw. Sinalost versetzten Tumorasцитeszell-Suspensionen mit Aqua dest. oder Ringerlösung gewaschen, d. h. wird der Lost ausgewaschen, so färben sich nach Zusatz frischer Trypanblaulösung (Ringer) alle Zellen sofort intensiv blau bis violett.

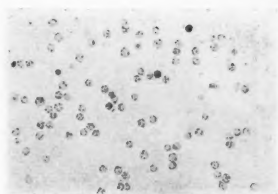
Röhrchen	N-Lost-Konz. in γ	Ergebnis der Zellfärbung	
		3 Std. bei 37° C	18 Std. bei 37° C
R _I	50	(++)	(++++)
R _{II}	100	(++)	(++++)
R _{III}	150	(+)	(+++)
R _{IV}	250	(+)	(++)
R _V	500	(-+)	(+)
	Sinalost		
R _{VI}	50	(++)	(++++)
R _{VII}	100	(++)	(++++)
R _{VIII}	150	(+)	(++)
R _{IX}	250	(+)	(+)
R _X	500	(-)	(-+)

Bei Versuch R_{IX} mit Sinalost z. B. sind bei einer Konzentration von 250 γ nach dreistündiger Bebrütung bei 37° C etwa 50% der Zellen gefärbt (Abb. 11), nach 18stündiger Bebrütung erscheinen etwa 20% blau (Abb. 13); werden diese Zellen jedoch mit Ringerlösung ausgewaschen und dann nochmal mit Trypanblaulösung gefärbt, so tritt eine totale Dunkelblaufärbung sämtlicher Zellen ein (Abb. 14). N-Lost in einer Konzentration von 500 γ dem Ascites zugesetzt und 3 Stunden bei 37° C bebrütet, ergibt nach Trypanblauzugabe nur eine Färbung einzelner Zellen (Abb. 15), nach 18stündiger

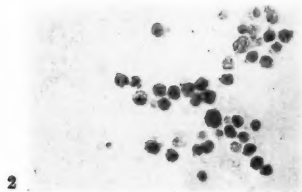
Abb. 1. Unbehandelter Tumorasцитes, trypanblaugefärbt. — Abb. 2. Bei 45° C 1 Stunde lang abgetötete Tumorasцитeszellen, trypanblaugefärbt. — Abb. 3. Bei 55° C 1 Stunde lang abgetötete Tumorasцитeszellen, Totale Trypanblaufärbung. — Abb. 4. Trypanblaugefärbte Tumorasцитeszelle (Typus II) und ungefärbte Zellen aus Ascites-N = Lost-Trypanblau-Mischung (roter Mitochondrienrest im Granulum, 900fach). — Abb. 5. Ascites-Lost Trypanblau-Sofortmischung, Vakuolenzelle, 900fach. — Abb. 6. N-Lost-Konzentration 50 γ , 3 Stunden bei 37° C bebrütet, 20–50% blaßblau gefärbte Zellen. — Abb. 7. N-Lost-Konzentration 500 γ , 3 Stunden bei 37° C bebrütet. Nur vereinzelte Zellen blau. — Abb. 8. N-Lost-Konzentration 50 γ , 18 Stunden bei 37° C bebrütet, Totalfärbung mit Trypanblau. — Abb. 9. N-Lost-Konzentration 500 γ , 18 Stunden bei 37° C bebrütet, etwa 20% der Zellen gefärbt. — Abb. 10. Sinalost-Konzentration 50 γ , dreistündige Bebrütung bei 37° C, 15–20% blaßblau gefärbte Zellen. — Abb. 11. Sinalost-Konzentration 250 γ , dreistündig bei 37° C bebrütet. — Abb. 12. Sinalost-Konzentration 50 γ , 18 Stunden bei 37° C bebrütet, Totale Dunkelblaufärbung.



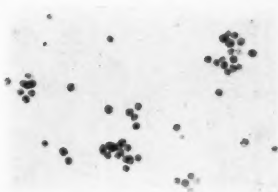
1



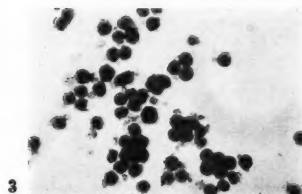
7



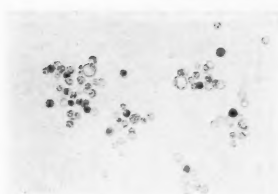
2



8



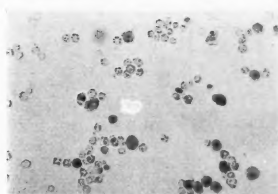
3



9



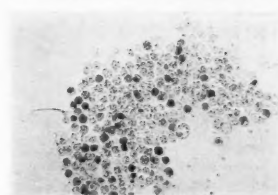
4



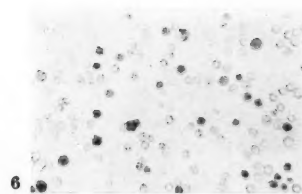
10



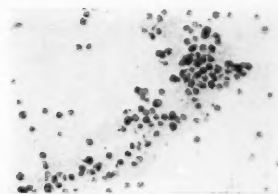
5



11



6



12

Bebrütung färbt Trypanblau etwa 15% der Zellen (Abb. 16), wird diese Suspension mit Ringerlösung gewaschen und dann sofort mit frischer Trypanblaulösung gefärbt, so färben sich augenblicklich sämtliche Zellen dunkelblau in der Art, wie Abb. 17 veranschaulicht. In den Zellen vom Typus II sind bläuliche Granula mit zentralem rotem Mitochondrienrest sichtbar.

In einer anderen Versuchsserie wurde frisch entnommener Tumorascites mit Trypanblaulösung versetzt, Ausstriche davon wurden unter das Mikroskop gebracht. Es traten keine gefärbten Zellen in Erscheinung. Nun wurde N-Lost durchgeleitet und dann Trypanblaulösung nachgesaugt, sofort färbten sich etwa 40–50% der Zellen dunkelblau (Abb. 18). Jetzt wurde bei demselben Präparat noch einmal N-Lost durchgeleitet mit dem Ergebnis, daß die bestehende Blaufärbung nachdunkelte (Abb. 19). Wird jetzt Trypanblau in Ringerlösung durchgesaugt, d. h. der N-Lost ausgewaschen, so nehmen sofort alle Zellen eine intensive Blaufärbung an (Abb. 20).

Werden gleiche Teile von Tumorascites, N-Lost, und Trypanblaulösung gemischt, so treten keine gefärbten Zellen auf, nur Fibringerinnsel sind blaßblau gefärbt (Abb. 21). Wird bei demselben Präparat während der mikroskopischen Beobachtung Trypanblau in Ringerlösung durchgesaugt, d. h. der N-Lost ausgewaschen, so färben sich schlagartig alle Zellen intensiv blau (Abb. 22).

Der Inhalt der Röhrchen (0,2 ml Ascites + 0,8 ml Ringerlösung) R_1 (Gesamtkonzentration an N-Lost = 50 γ), R_V (Gesamtkonzentration 500 γ N-Lost) und R_X (Gesamtkonzentration 500 γ Sinalost) wurde dreimal mit Ringerlösung gewaschen, zentrifugiert, abgossen und in 1 ml Ringerlösung aufgenommen. Je vier Mäusen wurden pro Maus 5,25 ml N-Lost-behandelter Tumorascites intraperitoneal verimpft. Nach sechs Wochen vom Tage der Verimpfung an gerechnet war noch kein Ascitescarcinom zur Entwicklung gelangt.

In einer anderen Versuchsserie wurde statt des sauren Disazofarbstoffes Trypanblau der basische Azinfarbstoff Neutralrot verwendet, der genau die gleichen Granula wie Janusgrün, also die Mitochondrien, färbt (vgl. P. G. Seeger 1937; P. G. Seeger und W. Schacht 1958). Werden Tumorasciteszellen mit einer N-Lost-Suspension (Konzentration 500 γ) versetzt und eine halbe Stunde bei 37°C bebrütet, so werden Ausstriche dieser Zellsuspension durch Neutralrot in Ringerlösung 1 : 5000 ebensowenig gefärbt wie durch Trypanblaulösung. Erst nach dreimaliger Durchspülung der Präparate mit Neutralrot-Ringerlösung, also erst nach Auswaschung des N-Lostes, färben sich die Mitochondrien bzw. Granula gelb bis braunrot, später die Kerne braun.

Durch den basischen Disazofarbstoff Bismarckbraun (Vesuvín) werden in den mit N-Lost wie Sinalost behandelten Tumorasciteszellen Granula (Mitochondrien?) blaßgelb gefärbt, werden die Präparate mit Farblösung durchströmt, d. h. wird der N-Lost bzw. Sinalost ausgewaschen, so nehmen die Granula eine intensive Gelbfärbung an bzw. Zellen mit vorher diffuser blaßgelber Farbe (Typus II–III) färben sich nunmehr stark gelb.

Eine schwach alkoholische Sudan-III-Lösung färbt die hell leuchtenden Cholesterinestergranula der Tumorasciteszellen sofort intensiv gelbrot, auch

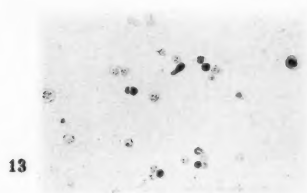
wenn die Zellen vorher mit N-Lost behandelt worden waren; wird frischer Ascites mit Sudan III gefärbt und dann mit N-Lost behandelt, so läßt sich der Farbstoff durch N-Lost nicht aus den Granula auswaschen, sondern diese behalten die gleiche Farbe bei.

Der basische Farbstoff Methylgrün (Teilchenradius $2,6 \times 10^{-8}$) färbt in drei Stunden bei 37°C bebrütetem Ascites in einer 50- γ -N-Lost-Konzentration höchstens 1% der Zellen; in einer 500 γ N-Lost enthaltenden Suspension tritt Totalfärbung ein. Der basische Farbstoff Methylviolett (Gentianaviolett), nicht wasserlöslich und stark fettfärbend (+++), mit einem Teilchenradius von $4,5 \cdot 10^{-8}$, bewirkt sowohl in einer 3 Stunden bei 37°C bebrüteten 50- γ - wie 500- γ -Suspension eine intensive Totalfärbung aller Zellen. Das basische Trypflavin, sehr gut wasserlöslich und ein spezifischer Phosphatidfarbstoff, färbt in einer 3 Stunden bei 37°C bebrüteten, 50 γ N-Lost enthaltenden Suspension die Zellen diffus blaßgelb, in der 500- γ -Suspension sind 5% der Zellen intensiv, 85% blaßgelb, 10% nicht gefärbt. Von den sauren Farbstoffen läßt das gut wasserlösliche, nicht fettlösliche Uranin mit dem Teilchenradius $3,44 \cdot 10^{-8}$ sowohl die bei 37°C bebrüteten Zellen der 50- γ - als auch der 500- γ -Suspension ungefärbt, das mittelmäßig (++) wasser- und fettlösliche (++) Eosin dagegen mit dem Teilchenradius $4,7 \times 10^{-8}$ erzeugt in der 50- γ -Suspension eine 50%ige Rotfärbung der Zellen, in der 500- γ -Suspension eine Totalfärbung. Nach einer 18stündigen Bebrütung bei 37°C ergeben sowohl in der 50- γ als 500- γ -Suspension die basischen Farbstoffe Methylgrün, Methylviolett und Trypflavin eine Totalfärbung der Tumorasцитeszellen. Von den sauren Farbstoffen bewirkt nur das wasser- wie lipoidlösliche Eosin eine Totalfärbung, die nicht fettlöslichen und nur wasserlöslichen Farbstoffe Uranin und Fluoreszin hingegen schlagen sich außen auf der Zell„membran“ nieder.

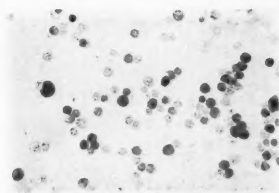
Diskussion der Ergebnisse

Unsere Versuche ergaben, daß im frischen Tumorasцитes nur wenige mit Trypanblau färbbare Zellen enthalten sind. Werden die Tumorasцитes-

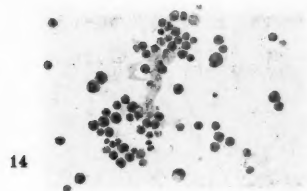
Abb. 13. Sinalost-Konzentration 250 γ , 18 Stunden bei 37°C bebrütet. Nur sehr wenig blaue Zellen. — Abb. 14. Präparat Abb. 13, ausgewaschen mit Ringerlösung und Nachfärbung mit Trypanblaulösung. Totale Dunkelblaufärbung. — Abb. 15. N-Lost-Konzentration 500 γ , 3 Stunden bei 37°C bebrütet. Einzelne Zellen blau gefärbt. — Abb. 16. N-Lost-Konzentration 500 γ , 18 Stunden bei 37°C bebrütet, etwa 15% der Zellen gefärbt. — Abb. 17. Präparat 16, mit Ringerlösung gewaschen und sofort mit Trypanblaulösung gefärbt. Totale Zellfärbung (dunkelblau). — Abb. 18. Ausstrich aus mit Trypanblaulösung versetztem Ascites nach N-Lost-Durchleitung und Nachsaugung von Trypanblaulösung, 40–50% blaue Zellen. — Abb. 19. Präparat 18 nach nochmaliger N-Lost-Durchleitung. Nachdunklung der blaugefärbten Zellen. — Abb. 20. Präparat 19 nach Durchsaugung von Trypanblau in Ringerlösung. Intensive Blaufärbung sämtlicher Zellen. — Abb. 21. Mischung gleicher Teile von Tumorasцитes, N-Lost- und Trypanblaulösung. Keine gefärbten Zellen, nur Fibringerinnsel blaßblau gefärbt. — Abb. 22. Präparat 21 nach Durchsaugung von Trypanblau in Ringerlösung. Intensive Blaufärbung aller Zellen.



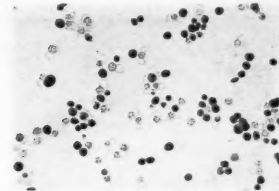
13



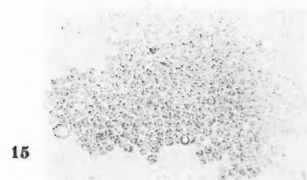
18



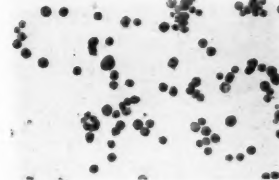
14



19



15



20



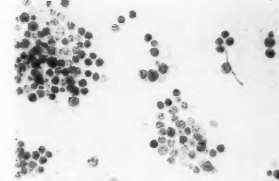
16



21



17



22

zellen 1 Stunde lang bei 45° C abgetötet, zeigen sofort etwa 80% der Zellen eine intensive Blaufärbung, der Rest färbt sich erst nach einer Farbeinwirkung von 5–10 Minuten blaßblau; nach einstündiger Einwirkung einer Temperatur von 55° C sind mehr als 90% der Zellen dunkelblau, der Rest ist blaßblau gefärbt. In anderer Auslegung bedeutet dies, da nur stark geschädigte bzw. abgetötete Zellen durch Trypanblau intensiv blau gefärbt werden, daß die Zellen in toto devital sind.

Tumorasciteszellen, denen N-Lost oder Sinalost in steigenden Konzentrationen (50 γ bis 500) zugefügt wurden, weisen bei geringer Konzentration (50 γ), wenn 3 Stunden bei 37° bebrütet, nur etwa 20–30% trypanblau-gefärbter Zellen, wenn 18 Stunden bei 37° bebrütet, dagegen eine Totalfärbung auf. Bei starker Konzentration von N-Lost (500 γ) sind nach dreistündiger Bebrütung nur einzelne, nach 18stündiger Bebrütung höchstens 20% der Zellen gefärbt, bei Sinalost nach dreistündiger Bebrütung 30% und nach 18 Stunden etwa 20%.

Aus diesen Feststellungen ist ersichtlich, daß die Färbbarkeit der Tumorasciteszellen mit Trypanblau mit zunehmender N-Lost- bzw. Sinalost-Konzentration schlechter wird, m. a. W. die Trypanblauspeicherung durch Tumorzellen ist der einwirkenden Lostkonzentration umgekehrt proportional. Es hat also den Anschein, als ob trotz starker Lostkonzentration weniger tote Zellen vorhanden wären. Diese Folgerung ist jedoch ein Trugschluß; denn wird der N-Lost oder Sinalost mit Ringerlösung ausgewaschen, so ergibt die nachfolgende Trypanblaufärbung eine totale intensive Dunkelblaufärbung. Die Zellen sind also tot, nur verhindert der an oder in den Zellen verankerte N-Lost bzw. Sinalost die Färbung durch Trypanblau. Für eine durch N-Lost oder Sinalost erzeugte Avirulenz ist somit nach Thumm die Trypanblauspeicherung kein Indikator, wenn diese chemischen Substanzen nicht nach einer bestimmten Einwirkungszeit wieder ausgewaschen werden.

Bezüglich des Mechanismus der Trypanblau„ausklammerung“ aus Tumorzellen durch Lostpräparate hat Thumm angenommen, daß diese chemischen Agenzien die Permeabilität der Zellen verändern. Betrachtet man das Problem von der Seite der Vitalfärbung, so dürften unsere Parallelversuche mit Neutralrot, Bismarckbraun und Sudan III aufschlußreiche Erkenntnisse vermitteln. Entscheidend für die vitale Farbstoffbindung ist eine Reihe von Faktoren, wie die Zahl, Verteilung und Dissoziation der auxochromen (bindenden) Gruppen, von denen die elektrostatische Adsorption abhängig ist, Doppelbindungen im Farbstoffmolekül, Molekulargewicht, Dissoziationskonstante, Größe und Form des Farbstoffmoleküls, Wasserlöslichkeit, Lipidlöslichkeit, isoelektrischer Punkt der zu färbenden Zellen usw.

Daß letzterer in unserem Falle keinen Einfluß auf die Farbbindung ausübt, dürfte daraus hervorgehen, daß Zusätze von $n/10$ HCl, $n/10$ NaOH, $n/10$ NH_3 auch in alkoholischer Lösung usw., d. h. Änderungen des pH-Wertes, die Färbbarkeit nicht ändern.

Vergleichen wir die benutzten Farbstoffe miteinander, so zeigt sich, daß

der saure Disazofarbstoff **Trypanblau** (p-p'-Diamino-m, m'-dimethyl-diphenyl-disazo-1-amino-8-naphthol-3,6-Disulfosäure)



in Wasser gut löslich (1%), **nicht** fettfärbend ist. Es ist ein grobdisperser Farbstoff, der Diffusionskoeffizient ist 6,5, es permeiert nicht durch die lebende Froschhaut und Muskelmembran.

Der basische Azinfarbstoff **Neutralrot** (2-Amino-3-methyl-7-Dimethylaminophenazoniumchlorid)



ist in Wasser sehr gut löslich (3%), **mittelmäßig** fettfärbend, der Teilchenradius beträgt $5,2 \cdot 10^{-8}$ in einer Konzentration von 1:6250, der Diffusionskoeffizient ist 2,6, es permeiert mäßig durch die Froschhaut und die Muskelmembran.

Der basische Disazofarbstoff **Bismarckbraun** (Vesuvion) (m-Phenylendiamin-disazo-bi-m-phenylendiamin)



besitzt **negative Wasserlöslichkeit** (Kiyono), 1% nach Harms, ist sehr gut lipoidlöslich (+++ nach Nirenstein), Teilchenradius $5,1 \cdot 10^{-8}$ in Konzentration 1:6250, Diffusionskoeffizient 6,5, permeiert gut durch die Froschhaut und Muskelmembran.

Der indifferente Fettfarbstoff **Sudan III** (Disazofarbstoff) 4-Aminoazotoluol-azo- β -naphthol)



ist in **Wasser unlöslich**, in Alkohol zu 0,15% löslich (Harms). Sudan III färbt nur postmortal (nach Fixation) Fett, und zwar in alkoholischer Lösung (Kiyono), vital und supravital färbt es nicht.

Würde das Molekulargewicht oder die Dissoziationskonstante die Farbbindung entscheidend beeinflussen, so müßte Neutralrot mit dem geringsten Molekulargewicht (288,8) und dem kleinsten Diffusionskoeffizienten (2,6) die lostbehandelten Tumorciteszellen am besten färben. Es färbt aber genau so wie Trypanblau (Mol.-Gew. 960,8) erst nach dreimaliger Auswaschung. Dagegen färbt der basische Disazofarbstoff **Bismarckbraun** trotz des gleich hohen Diffusionskoeffizienten wie Trypanblau (6,5) und des fast doppelt so hohen Molekulargewichts (419) wie Neutralrot sofort die mit N-Lost oder Sinalost behandelten Tumorciteszellen, die Auswaschung des Lestes verstärkt lediglich den Farbton. Dementsprechend müssen andere Faktoren von elektiver Bedeutung sein. Wie eine Gegenüberstellung zeigt, sind diese 1. die Wasserlöslichkeit der Farbstoffe, 2. die Fettlöslichkeit der Farbstoffe, 3. der Teilchenradius.

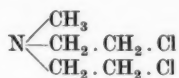
Die beiden, lostbehandelte Tumorciteszellen nicht tingierenden Farbstoffe Trypanblau und Neutralrot sind gut wasserlöslich, aber nicht bzw. nur mittelmäßig fettfärbend; Trypanblau ist grobdispers und Neutralrot besitzt einen ziemlich großen Teilchenradius ($5,2 \cdot 10^{-8}$).

Bismarckbraun dagegen ist nach Kiyono negativ wasserlöslich, nach Harms schlecht wasserlöslich, aber sehr gut lipoidlöslich (+++) und der Teilchenradius beträgt mit $3,1 \cdot 10^{-8}$ grob gerechnet etwa die Hälfte des Teilchenradius des Neutralrots. Wenn nun der in Wasser unlösliche indifferente Fettfarbstoff Sudan III trotz der N-Lost- oder Sinalost-Imbibierung der Zellen noch besser als Bismarckbraun und augenblicks färbt, so beweist das, daß die Lipoidlöslichkeit und wahrscheinlich auch der Teilchenradius entscheidend ist für die bevorzugte selektive Färbung durch diese beiden Farbstoffe. Da Sudan III nur postmortal färbt, beweist die Färbung der mit Lost imprägnierten Tumorzellen durch Sudan III gleichzeitig, daß diese tot sind.

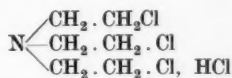
Die Gültigkeit der Ansicht, daß eine selektive Färbung lostbehandelter Asciteszellen nur durch lipoidlösliche Farbstoffe möglich ist, wird ferner belegt durch die Totalfärbung sowohl der 50 γ als auch der 500 γ N-Lost enthaltenden Suspension seitens des nicht wasserlöslichen, aber dreifach positiv fettlöslichen Methylviolett (Teilchenradius $2,6 \cdot 10^{-8}$) und des sowohl wasser- als auch fettlöslichen Eosin (Teilchenradius $4,7 \cdot 10^{-8}$). Daß der Teilchenradius nicht von entscheidender Bedeutung ist, dürfte aus der Tatsache hervorgehen, daß Methylgrün mit dem Teilchenradius $2,6 \cdot 10^{-8}$ und Uranin mit dem von 3,44 bzw. Fluoreszin mit dem von 3,5, also einem viel kleineren Teilchenradius als Methylviolett (4,5) und Eosin (4,7), lostbehandelte Tumorzellen nicht färben.

Aber weshalb dringen nur die in Fett löslichen, d. h. fettfärbenden Farbstoffe in die mit Lost imprägnierten Tumorzellen ein, die wasserlöslichen jedoch nicht, sondern diese erst nach der Auswaschung des Lostes? Diese Feststellung dürfte durch die Permeabilitätsverhältnisse der semipermeablen Zell„membran“ erklärt werden. Die histochemischen Reaktionen nach Casanova und nach Ciaccio hatten ergeben (Seeger 1938), daß in der Zellgrenzschicht der Tumorasiteszellen Lipide (Phosphatide) und Eiweiße mosaikartig angeordnet sind bzw. in der Zell„membran“ Proteide und Lipide in Form von Cenapsen miteinander verbunden sind (Polonovski).

Nach B. Flaschenträger (1951) verbindet sich Lost bzw. Stickstofflost bzw. Sinalost

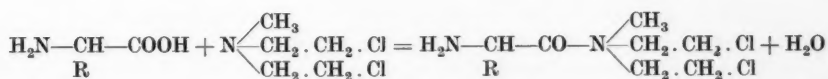


Stickstofflost



Sinalost

mit Proteinen ähnlich, wie sich Eiweißkörper mit Halogenfettsäuren umsetzen, wobei nach Herriott, Anson und Northrop (1946) in erster Linie die Carboxylgruppen verestert werden:



Durch die Reaktion der Eiweiße der Zellgrenzschicht mit Stickstoff- bzw. Sinalost würde demnach das Porenvolumen der Zellen so verengt, daß wasserlösliche Farbstoffe, wie Trypanblau, Neutralrot usw., via Eiweißmosaik der Zell„membran“ nicht mehr in die Zelle permeieren, fettlösliche Farbstoffe, wie Bismarckbraun, Sudan III usw., hingegen via Lipoidmosaik ungehindert passieren können. Wird der Lost ausgewaschen, d. h. das Eiweiß der Zell„membran“ von dem (wahrscheinlich in lockerer Bindung) anhaftenden Lost befreit, so ist die Zell„membran“ wieder für die wasserlöslichen, aber nicht fettlöslichen Farbstoffe Trypanblau und Neutralrot passabel.

Damit wurde nachgewiesen, daß infolge der durch Lostbehandlung bewirkten besonderen Beeinflussung der Zellpermeabilität wasserlösliche Farbstoffe, wie Trypanblau, Neutralrot usw., nicht färben; das Gelingen der Sudan-III-Färbung nach Lostbehandlung hingegen beweist sofort, daß die Zellen tot sind, welcher Beweis nach Auswaschung des Lostes auch durch die Trypanblaufärbung erbracht werden kann. Demnach ist Trypanblau unter biologischen Verhältnissen ein Indikator für stoffwechselgeschädigte bzw. tote Zellen, es ist aber durchaus auch ein spezifischer Indikator für tote Tumorzellen bzw. für deren Avirulenz, wenn die chemischen Substanzen, welche die Färbung verhindern, vor bzw. während der Färbung ausgewaschen werden.

Zusammenfassung

Untersuchungen von A. Wenzlaff (1924) an Froschlungen, P. G. Seeger (1931) an Leydigischen Zellen der Urodelenhaut, P. G. Seeger (1936/1937), E. Haagen und P. G. Seeger (1938) und P. G. Seeger und W. Schacht (1958) an Tumorsciteszellen hatten ergeben, daß der grobdisperse Disazofarbstoff Trypanblau nur geschädigte bzw. tote Zellen färbt. Hierbei wurde der Farbstoff unter biologischen Verhältnissen angewendet. W. Thumm versuchte 1954 Trypanblau als Indikator für die Avirulenz von Tumorzellen nach Einwirkung zelltötender chemischer Faktoren *in vitro* zu verwenden. Er fand jedoch keinen Unterschied in der Prozentzahl trypanblaugefärbter unbehandelter Tumorzellen gegenüber N-Lost- und Sinalost-behandelter Zellen.

Zur Klärung dieser Diskrepanz wurden Serienversuche durchgeführt, die folgende Ergebnisse brachten:

1. Einstündige Einwirkung einer Temperatur von 45° C führt zur intensiven Blaufärbung von etwa 80% der Zellen, der Rest färbt sich im Laufe von 5–10 Minuten blaßblau.
2. Einstündige Einwirkung einer Temperatur von 55° C tötet mehr als 90% der Zellen (Dunkelblaufärbung), der Rest ist blaßblau gefärbt. Demnach müssen nach Einwirkung dieser Temperatur alle Zellen als devital betrachtet werden.
3. Nach Bebrütung in N-Lost- bzw. Sinalost-Suspensionen bei 37° C sind bei geringer Lostkonzentration (50 γ) nach 3 Stunden etwa 20–30% der Zellen gefärbt, nach 18 Stunden ist eine Totalfärbung zu verzeichnen; bei

hoher Konzentration (500 γ) sind nach drei Stunden nur einzelne, nach 18 Stunden höchstens 20% der Zellen gefärbt. Die Trypanblaufärbbarkeit von Tumorzellen verschlechtert sich also mit zunehmender Lostkonzentration im Medium, d. h. die Trypanblauspeicherung in Tumorzellen ist der einwirkenden Lostkonzentration umgekehrt proportional.

4. Nach Auswaschung des N-Lostes bzw. Sinalostes durch Ringerlösung oder auch nach Durchsaugung von Farb-Ringerlösung nehmen alle Zellen augenblicks eine dunkelblaue Farbe an, sind also tot. Die Lostimprägation an bzw. in den Zellen hat demnach die Färbung verhindert und die avirulenten Tumorzellen treten irrtümlicherweise als virulent in Erscheinung. Für die durch chemische Faktoren erzeugte Avirulenz ist demzufolge Trypanblau kein Indikator, sofern die chemischen Substanzen nicht vor bzw. während der Färbung ausgewaschen werden.

5. Die Ursache der Trypanblau„ausklammerung“ aus Tumorzellen durch Lost konnte durch Vergleiche mit den Farbstoffen Neutralrot, Bismarckbraun (Vesuvín) und Sudan III aufgezeigt werden. Die gut wasserlöslichen, aber nicht fettlöslichen bzw. fettfärbenden Farbstoffe Trypanblau und Neutralrot permeieren nicht in lostimprägnierte Tumorzellen, dagegen dringen die nicht wasserlöslichen, aber gut fettfärbenden Farbstoffe Bismarckbraun und Sudan III unverzüglich in die lostimprägnierten Tumorzellen ein und färben um so intensiver, je stärker ihr Fettfärbungsvermögen ist. Maßgeblich für das Nichtgelingen oder das Gelingen einer Färbung lostimprägnierter Tumorzellen sind folgende Faktoren: a) die Wasserlöslichkeit, b) die Fettlöslichkeit, c) der Teilchenradius der verwendeten Farbstoffe.

6. Da Sudan III Zellen nur postmortal färbt, beweist die Färbung lostimprägnierter Tumorzellen durch Sudan III unmittelbar deren Mortalität bzw. Avirulenz ohne vorherige Auswaschung.

7. Die Trypanblau- und Neutralrot„ausklammerung“ durch Lostimprägation der Tumorzellen wird durch eine Änderung der Permeabilitätsverhältnisse in der Zell„membran“ bedingt, indem durch wahrscheinliche Bindung des N-Lostes bzw. Sinalostes an die Carboxylgruppen der Eiweiße der Zell„membran“ das Porenvolumen der Zellgrenzschicht so verändert wird, daß wasserlösliche, einen großen Teilchenradius besitzende Farbstoffe (Trypanblau, Neutralrot) via Eiweißmosaik nicht mehr in die Zellen permeieren, gut fettlösliche Farbstoffe wie Bismarckbraun und besonders Sudan III hingegen ungehindert via Lipoidmosaik passieren können.

Ist der Disazofarbstoff Trypanblau im biologischen Milieu ein spezifischer Indikator für geschädigte bzw. tote Zellen, so ist er durchaus auch ein spezifischer Indikator für die Mortalität bzw. Avirulenz von N-Lost- bzw. Sinalost-behandelten Tumorzellen, sofern diese chemischen Substanzen, welche die Zellpermeabilität beeinflussen, vorher ausgewaschen werden.

Literatur

- Casanova, 1930: Vgl. H. Thierfelder, und E. Klenk, Die Chemie der Cerebroside und Phosphatide, S. 87, Springer, Berlin.
Ciaccio, 1901: Ziegler 50, 317.

- Ciaccio, 1909: Zbl. Path. 20, 385, 771.
— 1910: Arch. Zellforsch. 5, 2.
— 1910: Virchows Arch. 199, 378.
— 1910: An. An. 35, 17.
— 1913: Zbl. Path. 24, 49.
— 1920: C. r. Ass. Anat. 21, 160.
— 1926: An. An. 71, 216.
— 1926: Bull. Soc. Ital. Sper. 1, 47.
— 1930: C. r. Ass. Anat. 25, 87.
— 1931: Bull. Soc. Ital. Sper. 5, 301.
— 1933: Bull. Soc. Ital. Sper. 8, 324.
— 1934: Bull. Soc. Ital. Sper. 9, 137.
— 1936: Mon. Zool. ital. 47, 24.
- Flaschenträger, B., 1951: Physiol. Chemie. Springer, Berlin.
- Herriott, Anson, und Northrop., 1946: J. gen. Physiol. 30, 185.
- Haagen, E., und P. G. Seeger, 1938: Z. Krebsforsch. 47, 394.
- Harms, H., 1957: Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie, Staufen Verlag, Kamp-Lintfort.
- Kiyono, K., S. Sugiyama und S. Amano, 1931: Proc. Roy. Soc., Lond. Ser. B 107, 101.
— — — 1938: Die Lehre von der Vitalfärbung. Isseido, Kyoto (Japan).
- Polonoski, M., 1951: Medizinische Biochemie, 5. Aufl. K. F. Haug, Berlin.
- Seeger, P. G., 1937: Arch. exper. Zellforsch. 20, 208.
— 1938: Arch. exper. Zellforsch. 21, 308; 22, 356.
— 1939: Z. mikrosk.-anat. Forsch. 46, 153.
— 1940: Arch. exper. Zellforsch. 24, 59.
— 1940: Z. mikrosk.-anat. Forsch. 48, 181, 631, 639; 53, 65.
— 1940: Klin. Wschr. 19, 107.
— 1950: Dtsch. Ges. Wesen 37, 1157.
— 1950: Z. Krebsforsch. 57, 113.
— 1950: Ther. Gegenw. 9, 307.
— 1951: Dtsch. Ges. Wesen 24, 669.
— 1951: Z. Krebsforsch. 57, 387.
— 1951: Die Pharmazie 9, 462.
— 1951: Hippokrates 13, 351.
— 1951: Krebsarzt 7/8, 198; 9/10, 304.
— 1952: Dtsch. Ges. Wesen 29, 905.
— 1952: Hippokrates 10, 279; 15, 422.
— 1952: Wien. med. Wschr. 15, 282.
— 1952: Dtsch. med. Mschr. 8, 489.
— 1953: Dtsch. med. Monatsschr. 2, 71; 11, 697.
— 1953: Die Heilkunst 9, 304.
— 1953: Ldarzt 2, 31.
— 1953: Ärztl. Praxis V/46, 14.
— 1953: Dtsch. med. J. 7/8, 150.
— 1954: Dtsch. med. Mschr. 6, 365.
— 1954: Klin. Med. (Wien) IX/2, 84.
— 1954: Fol. haemat. (D.) (Festschrift für Prof. Schilling) 72, 2.
— 1954: Berl. Ges. Bl. 14.
— 1954: Ärztl. Forsch. IX/8, 399.

- Seeger, 1955: Hippokrates 24, 565.
 — 1955: Berl. Ges. Bl. 4, 114; 7, 186; 9, 232—234.
 — 1955: Therapiewoche 9/10, 203.
 — 1956: Vitalstoffe, Heft 5.
 — 1957: Dtsch. Ges. Wesen 41, 1265.
 — 1958: Z. ges. inn. Med. 14, 506.
 — und W. Schacht, 1959: Acta histochem. 15, 542.
 Thumm, W., 1954: Z. Krebsforsch. 60, 91.
 Wentzlaff, A., 1924: Z. Zellenlehre 1.

Untersuchungen über den Einfluß der Ultrazentrifugierung auf den Bewegungs-, Teilungs- und Entwicklungsrhythmus des Eies von *Parascaris equorum* (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilmes

Von

Josef Lamina

Aus dem Institut für Kinematische Zellforschung der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Mit 56 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Juni 1958)

Inhalt

	Seite
I. Einleitung	15
II. Besondere technische Hilfsmittel	16
III. Die Vorbereitung der <i>Parascaris</i> -Eier für die Zeitrafferfilm-Aufnahme	19
IV. Der Bewegungsrhythmus der Granula	19
1. Definition des Begriffes „Granula“	19
2. Meßmethode für die Granulabewegung (GB) und Erläuterung des Auswertverfahrens des Zeitrafferfilmes	20
3. Meßergebnisse	23
a) Die Granula-Bewegung im nichtzentrifugierten Ei während der ersten Teilung	23
b) Die Granula-Bewegung im ultrazentrifugierten „geschichteten Ei“ während der ersten Teilung	24
c) Die Granula-Bewegung im ultrazentrifugierten „Ball-Ei“ während der ersten Teilung	26
d) Beobachtungen zur Entstehung von „Ball-Eiern“	27
e) Die Granula-Bewegung in verschiedenen Stadien der Ultrazentrifugierung vor oder nach der ersten Teilung	30
f) Die Granula-Bewegung in Einzellenstadien während der ersten Teilung mit abzentrifugiertem „Ball“	32
V. Der Teilungsrhythmus des <i>Parascaris</i> -Eies unter Zeitraffung	33
1. Messende Analyse der Bildung der Teilungsfurche	33
2. Meßergebnisse	34
a) Die Bildung der Teilungsfurche in nicht zentrifugierten Eiern bei Zimmertemperatur	34

J. Lamina: Untersuchungen über den Einfluß der Ultrazentrifugierung	15
b) Die Bildung der Teilungsfurche an Eizellen bei verschiedener Temperatur	35
c) Die Bildung der Teilungsfurche senkrecht zur Schichtung im ultrazentrifugierten Ei	36
d) Die Bildung der Teilungsfurche parallel und schräg zur Schichtung im ultrazentrifugierten Ei	37
e) Die Bildung der Teilungsfurche bei „Ball-Eiern“	38
f) Die Bildung der Teilungsfurche bei ultrazentrifugierten Eizellen mit ungleichmäßiger Granula-Verteilung	39
g) Die Bildung der Teilungsfurche bei Eizellen mit abzentrifugiertem Ball	40
h) Die Teilung der Zelle S_1 in A und B in nicht zentrifugierten und ultrazentrifugierten Eizellen	40
i) Die Teilung der Zelle P_1 in EMST oder S_2 und P_2 im nicht zentrifugierten und ultrazentrifugierten Ei	41
VI. Allgemeiner Teil. (Gegenüberstellung von Ergebnissen aus dem Schrifttum und eigenen Beobachtungen)	41
1. Die Granula-Bewegung nach Angaben im Schrifttum	42
2. Die Granula-Bewegung (GB) nach eigenen Beobachtungen	43
3. Ultrazentrifugierungsversuche an Eizellen während der Teilung nach Angaben aus dem Schrifttum	48
4. Der Teilungsablauf nicht zentrifugierter und ultrazentrifugierter Eizellen nach eigenen Beobachtungen	50
5. Die Abhängigkeit von Granula-Bewegung und Teilungsrhythmus	57
VII. Beobachtungen zum Teilungs- und Entwicklungsrhythmus älterer Keime	58
VIII. Zusammenfassung der Ergebnisse	62
Literatur	63

I. Einleitung

Für den Biologen ist das *Parascaris*-Ei ein klassisches Untersuchungsobjekt. Es erwies sich als besonders günstig für Mitosestudien und entwicklungsphysiologische Fragestellungen. Neuerdings wurde bei diesem wegen seiner widerstandsfähigen Hüllen, leider für experimentelle Eingriffe sehr unzugänglichem Objekt, auch die Ultrazentrifugierung angewandt (z. B. Beams und King ab 1936).

Wurde der Zeitrafferfilm in der Zytologie häufig nur zur Erfassung des dynamischen Vorganges der Zellteilung als Ganzes verwandt, so sollen hier Einzelvorgänge, die in besonderer Weise während der Zellteilung ablaufen, und die die Teilung direkt oder indirekt beeinflussen, untersucht werden.

Einer dieser Einzelvorgänge ist die Granula-Bewegung (GB). Sie ist nur unter Änderung des Zeitfaktors sichtbar und kann als Kriterium für die Viskosität sowie Vitalität einer lebenden Zelle dienen.

Diese Bewegung der Granula soll einer eingehenden Untersuchung besonders am ultrazentrifugierten Ei während der ersten Teilung unterworfen und mit der Intensität der GB einer nicht zentrifugierten sich teilenden Zelle verglichen werden. Der Einschnü-

rungsvorgang der Eizelle bei der Teilung soll dabei besonders berücksichtigt werden.

Zur Kontrolle etwa auftretender Schädigungen infolge der Ultrazentrifugierung wurde bei einer Reihe von Eiern auch die spätere Entwicklung untersucht.

Es sei bereits hier darauf hingewiesen, daß sich sämtliche Angaben über Bewegungsvorgänge auf das Zeitrafferlaufbild beziehen.

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W. Kuhl, sei an dieser Stelle für die Stellung der Aufgabe, für die stets freundliche Aufgeschlossenheit gegenüber meiner Problemstellung, sowie für die Möglichkeit sie mit einer solchen speziellen Methode durchzuführen, herzlicher Dank gesagt.

Da die Beschaffung von *Parascaris equorum* auf immer größere Schwierigkeiten stößt, war die Unterstützung der Schlachthöfe von Frankfurt a. M. und Offenbach besonders wertvoll. Ich danke der Betriebsleitung der Schlachthöfe und allen Beteiligten bestens.

II. Besondere technische Hilfsmittel

Die Herstellung der Präparate für die Mikrozeitraffer-Filmaufnahme, vor allem von zentrifugiertem Eimaterial, erforderte besondere Sorgfalt wegen der langen Zeiträume der Filmaufnahme. Zwei Grundbedingungen waren zu erfüllen: Erstens mußte das Material während der Aufnahme völlig ruhig liegen und zweitens mußte im Präparat zur ungestörten Entwicklung genügend Sauerstoff im umgebenden Wasser vorhanden sein. Zweier- oder dreiseitig mit Paraffin umrandete Deckglaspräparate erwiesen sich als ungeeignet. Bewährt hat sich der „Verdunstungsschutzrahmen“ nach Kuhl (1954). Dieses kleine Hilfsgerät aus Plexiglas, in allen Größen und Varianten leicht selbst herzustellen, hat eine doppelte Wandung, besteht also aus einem äußeren und inneren Rahmen. So entsteht im Querschnitt eine rechteckige Rinne, die mit Watte ausgefüllt werden kann. Zum Gebrauch wird die Watte angefeuchtet; der Verdunstungsschutzrahmen, der der Größe des jeweiligen Deckglases genau angepaßt ist, wird über das Deckglas gestülpt. Der Deckglasrand steht fast in Verbindung mit der nassen Watte. Das verdunstende Wasser unter dem Deckglas wird, solange die Watte feucht ist, von dem Wasser der Watte ergänzt. Es empfiehlt sich, den Verdunstungsschutzrahmen jeweils an eine größere Deckglassorte als 18×18 mm anzupassen, da sonst beim Gebrauch von stärkeren Objektiven kein Spielraum zur Verschiebung des Präparates vorhanden ist. Versieht man den Verdunstungsschutzrahmen an seinen Seiten noch mit je einem dünnen Halteplättchen, ebenfalls aus dünnem Plexiglas, so kann man leicht den Objektträger mitsamt dem Verdunstungsschutzrahmen durch Halteklemmen am Mikroskoptisch festlegen. Erstreckt sich eine Beobachtung über mehrere Tage, so kann man die mit Watte angefüllte rechteckige Rinne oben anbohren und eine mit Wasser gefüllte Glaspipette aufsetzen. Es wird hierdurch eine völlig störungsfreie Entwicklung der Eier gesichert.

Die zentrifugierten Eier verlangen eine horizontale Anordnung der Kamera und des Mikroskopes. Durch das Zentrifugieren entsteht in den Ei-

zellen eine Schichtung je nach dem spezifischen Gewicht der Ei materialien. Eine senkrechte Anordnung der Aufnahmeapparatur hätte zur Folge, daß sich die zentrifugierten Eier im perivitellinen Raum der Eihülle wie „Stehaufmännchen“ verhalten und jeweils nur die Aufsicht auf die spezifisch leichteste Eischicht gestattet hätten. Da ein Pressen und damit verbunden ein Festlegen der Eizellen vermieden werden mußte, gewährleistete die horizontale Anordnung der Aufnahmeapparatur eine Aufsicht auf alle im ultrazentrifugierten Ei befindlichen Schichten (Abb. 1).

Die Aufnahmen erfolgten mit der Mikrozeitrafferkamera nach Kuhl von E. Leitz. Die Kamera hat den Vorteil, daß man sie an einem einfachen

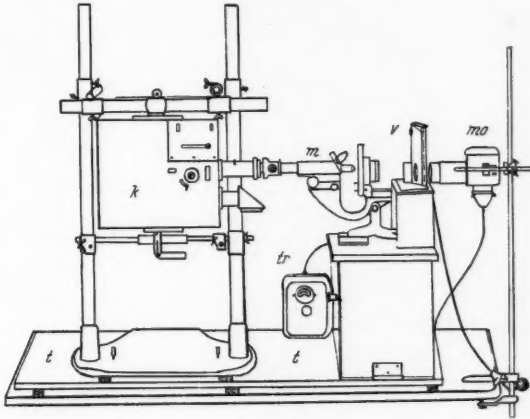


Abb. 1. *k* = Zeitraffer-Kamera nach Kuhl von E. Leitz. *m* = Mikroskop, *p* = Magnetverschuß für die Lichtquelle = *l* (siehe dazu auch Abb. 2).

Haltegestänge in jeder beliebigen Lage und Stellung anbringen kann. Jedes Mikroskop eignet sich für die Kombination mit dieser Kamera (Einergangskurbel mit Handbetrieb).

Die Aufnahmen erfolgten unter Benutzung der Objektive 7 F (58 ×), 6 L (45 ×) und dem Periplan-Okular 10 × (Leitz). Als Lichtquelle diente eine einfache Monla-Lampe bei 5,5 Amp. Vor die Öffnung des Magnetverschlusses für die Zeitraffereinrichtung wurde ein Orange-Filter OG 5 geschaltet, das sich für kontrastreiche Aufnahmen als günstig erwies.

Die rhythmische Belichtung erfolgte mit der abgeänderten Zeitraffer-Einrichtung von W. Schwöbel (1952, Abb. 2).

Ein Synchronmotor (AEG) betreibt über eine Schnecke eine Welle, auf der sich fünf Scheiben befinden, die an ihrer Peripherie verschieden große, 2 mm tiefe Sektoren ausgefeilt aufweisen. Nur die nicht ausgefeilten Sektoren der Scheiben sind in der Lage, den Stromkreis zu schließen. Durch die Wahl eines bestimmten Zahnrades kann die Kontaktgeberwelle sich in einer Zeiteinheit einmal um 360° drehen. Die verschieden groß ausgefeilten Sektoren der fünf Scheiben legen die Belichtungszeit fest. Für die hier vor-

liegenden Experimente wurde eine Umdrehungszahl der Kontaktgeberwelle von 6/pro Minute gewählt. Es wurden also 6 Bilder in einer Minute aufgenommen; das entspricht einer Raffung der Zeit auf das 160fache (Kuhl 1949). Die Belichtungszeit wurde auf jeweils eine Sekunde fest-

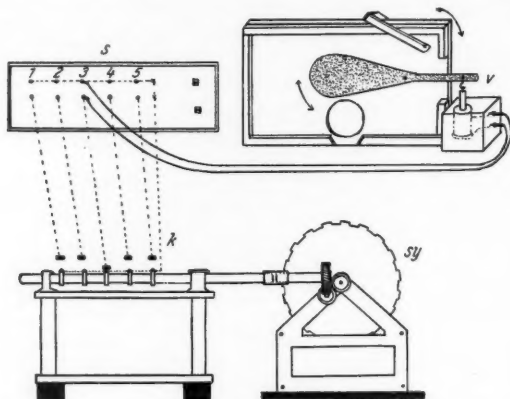


Abb. 2. *sy* = Synchronmotor (AEG), der, über eine Schnecke und auswechselbare Zahnräder, die Kontaktgeberwelle antreibt. *s* = Schaltbrett, auf dem fünf verschiedene Kontakte mit der Kontaktgeberwelle hergestellt werden können. *v* = elektromagnetischer Verschluss mit punktierter Verschlussklappe, im Schnitt gezeichnet (verändert nach Schwöbel).

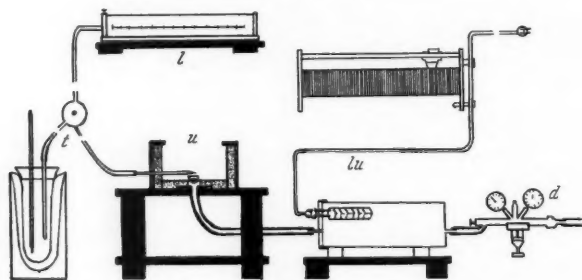


Abb. 3. *u* = Zentrifuge im gummiausgekleideten Schutzgehäuse. *lu* = Luftvorwärmer mit Regulierwiderstand. *t* = Thermoelement zur Temperaturmessung der entspannten Luft über dem laufenden Rotor mit Thermosonde. *l* = Lichtstrichgalvanometer zum Ablesen der Temperatur (Hartmann & Braun). *d* = Druckluftanschluß zum Kompressor (nach Schwöbel, verändert).

gelegt. Wird durch eine der fünf Scheiben mit ihrem nicht ausgefeilten Sektor der Stromkreis geschlossen, so wird durch ein Gewicht, das in eine Magnetspule hineingezogen wird, die in der Abbildung punktierte Klappe hochgehoben und ein Teilbild belichtet (genauere Erklärung dazu siehe Schwöbel 1952).

Bei der Ultrazentrifugierung waren hier jeweils nur 2–3 Tropfen Wasser mit den Eiern für die Rotation erforderlich. Es konnte die Konstruktion einer preßluftangetriebenen Ultrazentrifuge (Henriot et Hugeneuward 1925, zitiert nach Svedberg 1940) angewandt werden. Diese Ultrazentrifuge wurde von W. Schwöbel (1952) in vereinfachter Form im Institut entwickelt.

Der Rotor mit einem äußeren Durchmesser von 16 mm (wirksamer Radius 6 mm) erreicht bei 5 atü Druck eine Umdrehungszahl von 5400/sec. Dies ergibt etwa den 500.000fachen Betrag der Schwerefeldstärke „g“. Für die vorliegenden Versuche genügte die Schwerefeldstärke, die bei dem Betrieb der Ultrazentrifuge mit 1,5–2 Atm. erreicht wurde. Nach einigen Minuten trat je nach dem Entwicklungszustand der Eier eine Schichtung bzw. „Ballbildung“ ein.

Ein Nachteil des mit Luft angetriebenen Rotors besteht darin, daß beim Austritt der entspannten Luft aus den Düsen der Rotor mitsamt seinem Inhalt stark abgekühlt wird. Dies stört die Entwicklungsvorgänge im *Parascaris*-Ei. Durch Vorwärmen der Preßluft (lu, Abb. 3) kann dieser Fehler beseitigt werden. Mit einem Thermoelement läßt sich unmittelbar die Temperatur der entspannten Luft und damit auch hinreichend genau die des zentrifugierten Materials bestimmen.

Abb. 3 gibt ein Schema der relativ einfachen Ultrazentrifuge.

Neben die möglichst häufige Beobachtung des Zeitrafferlaufbildes trat die Teilbildanalyse. Diese wurde mit Hilfe des Filmauswertapparates nach W. Kuhl (1949) durchgeführt.

III. Die Vorbereitung der *Parascaris*-Eier für die Zeitrafferfilm-aufnahme

Die reifen *Parascaris*-Weibchen wurden dem Dünndarm frisch geschlachteter Pferde entnommen. Die ersten 2 cm des mit Eiern angefüllten zweiteiligen Uterus wurden in ein kleines Glasröhrchen übertragen und mit abgekochtem Wasser, dem eine kleine Menge Citro-Pepsin hinzugefügt war, übergossen und mit einem Kork luftdicht verschlossen. Die Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank bei +2°. Nach etwa vier Wochen lösen sich die Eier aus dem Uterus und fallen auf den Boden des Gläschens. Das Citro-Pepsin hat inzwischen seine Wirkung getan; die klebrige, gelatinöse Schicht, die der Eischale anhaftet, ist beseitigt. Vier Wochen derart behandelte Eier erwiesen sich als besonders günstig für die weiteren Versuche. In frischem Leitungswasser abgespült und belassen, setzt nach wenigen Stunden die erste Teilung ein.

IV. Der Bewegungsrhythmus der Granula

1. Definition des Begriffes „Granula“

Das Schema der Abb. 4 stellt von einem ultrazentrifugierten *Parascaris*-Ei die Größenverhältnisse und verschiedene Lage der im Zytoplasma vorliegenden Einschlüsse dar.

In dem der Zentrifugenachse abgewendeten Teil des Eies, im Bild unten, liegt eine Anhäufung kleiner Zytoplasmacinschlüsse. Diese Einschlüsse werden im Schrifttum häufig nur unter dem Namen „Granula“ angeführt. Sie haben einen Durchmesser von etwa $0,1-0,3 \mu$. Daran schließt sich eine homogen durchsichtige Plasmaschicht an, die die beiden Vorkerne bzw. den

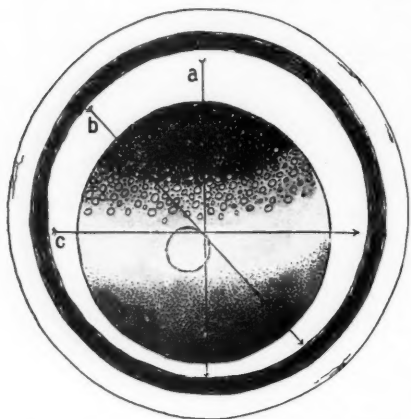


Abb. 4. Schema eines ultrazentrifugierten Eies mit deutlicher Schichtung. Die Pfeile, in der Abb. mit *a*, *b*, *c* bezeichnet, stellen den jeweils möglichen Verlauf der Teilungsfurche dar. Zentrifugal (der Zentrifugenachse abgewendet, im Bild unten) liegen die kleinen, spezifisch schwersten Granula; zentripetal (der Zentrifugenachse zugewendet, im Bild oben) die großen Granula, die in den vorliegenden Versuchen genau untersucht werden.

Zellkern enthält. Darauf folgt eine Zone von großen kugelartigen Einschlüssen, die meist als *Sphaerulae* bezeichnet werden. Es soll sich nach den Angaben in der Literatur um „Vakuolen“ handeln, die in ihrer Größe stark variieren. In dem der Zentrifugenachse zugewandten Teil des Eies liegt die spezifisch leichteste Eischicht, bestehend aus etwa 1μ großen, kugeligen Einschlüssen, die man durch Ultrazentrifugieren völlig aus dem Ei entfernen kann. Diese werden häufig „Dottergranula“ oder auch „Ölkugeln“ genannt. Sie stellen ohne Zweifel Reservestoffe dar und bestehen im wesentlichen aus Fetten; ihre Färbbarkeit und ihre Oberflächenspannung sichern diese Auffassung.

Wenn im folgenden von Granula, oder Ballgranula die Rede ist, so handelt es sich immer um diese 1μ großen Zytoplasmacinschlüsse,

die den spezifisch leichtesten Ei-Inhalt bilden. Alle anderen Einschlüsse werden bei der Betrachtung besonders erwähnt.

2. Meßmethode für die Granulabewegung und Erläuterung des Auswertverfahrens des Zeitrafferfilmes

Sollen die Meßergebnisse exakt sein, so muß dafür gesorgt werden, daß die Eizellen während des Versuches völlig ruhig liegen und keinem Deckglasdruck ausgesetzt werden, obwohl dieser nach Schwöbel (1952) keine Bedeutung für die GB haben soll. Ein Festlegen der Eizelle im perivitellinen Raum würde durch die dadurch entstandenen Fixpunkte die Messung sehr vereinfachen. Da dies nicht der Fall ist, wird das Meßverfahren komplizierter und erfordert sehr viel Zeit und Geduld.

Es steht einwandfrei fest, daß die Bewegungsvorgänge im Ei von *Paras-*

caris equorum sehr komplexer Natur sind. Es sei darauf hingewiesen, daß gleichzeitig mit der GB auch noch andere Bewegungen, besonders während der Teilung, auftreten, die wiederholt beobachtet wurden. Auch ähnliche Feststellungen bei anderen Versuchsobjekten können angeführt werden.

a) Bereits subjektiv feststellbar, am besten bei binokularer Betrachtung und 1000facher Vergrößerung, ist ein schnelles Hin- und Herrücken der Eizelle im perivitellinen Raum; die Zelle „vibriert“ mit geringer „Frequenz“.

b) Nicht zu übersehen sind Plasmaströmungen, die bei Nematoden eindeutig von Zeit zu Zeit in bestimmten Entwicklungsphasen auftreten (siehe Filme). Zunächst wird außer acht gelassen, welcher Herkunft sie sind. Ihnen dürfte eine besondere Rolle, besonders im ultrazentrifugierten Ei-Material, zukommen.

c) Daneben müssen auch Bewegungen wie die der Vorkerne, die Ausbildung der Spindel, ferner Vorgänge, die in der Kernmembran festgestellt wurden, berücksichtigt werden, weil auch durch sie die GB in irgendeiner Weise beeinflusst werden kann.

d) Auch verschiedene Eibewegungen und Kontraktionserscheinungen wie sie z. B. bei Blaufelchen-Eiern, den Eiern von Ascidien (Vandebroek 1937) beobachtet wurden, sind hier zu erwähnen und mögen vielleicht auch im *Parascaris*-Ei die Bewegungsvorgänge beeinflussen.

e) Nicht zu vergessen sind schließlich die Bewegungen, die sich bei der Durchschnürung der Eizelle oder kurz vorher abspielen. Hierbei können nach Angaben mehrerer Autoren Drehbewegungen des ganzen Keimes, besonders starke „Verschiebungen“ von Plasma z. B. bei *Psammochinus miliaris* erfolgen, so daß Kuhl (1949 a) von „Massenausgleichsbewegungen“ spricht.

Diese Aufzählung ließe sich noch um ein beträchtliches erweitern; sie soll genügen, um die Schwierigkeit anzudeuten, aus diesem zytodynamischen Gesamtgeschehen einen einzelnen Teilvorgang, nämlich den der GB herauszugreifen und ihn exakt zu untersuchen.

Subjektive Beobachtungen versagen hier völlig. Es war also notwendig, nach einer Methode vorzugehen, die es gestattet, neben den oben angeführten Tatsachen ein brauchbares Maß für die Intensität der GB zu ermitteln. Dieses Maß für die Intensität der Granula-Bewegung wird im folgenden als „Relatives Verschiebungsmittel“ (RVM) (Einstein 1922) bezeichnet. Das RVM ist definiert als die auf eine Ebene projizierte mittlere Lageverschiebung mehrerer Granula in einer Zeiteinheit (1 Minute). Diese Meßmethode wurde in einer etwas abgeänderten Form bereits von W. Schwöbel (1952) für die GB im *Parascaris*-Ei mit Erfolg angewandt.

Zur Ermittlung des RVM wird eine möglichst große Anzahl von Granula, die über den ganzen Eibezirk verteilt sein sollen, in ihrer Anfangslage auf dem vom Auswertapparat auf das Transparentpapier projizierten Teilbild eingetragen. Über mehrere Teilbilder hinweg werden die einzelnen Granula weiter verfolgt und erneut eingezeichnet. Länger als 5 Minuten

(30 Teilbilder) läßt sich ein Granulum nur selten verfolgen. Da es sich bei diesem Auswertverfahren nur um ein auf eine Ebene projiziertes Bild handelt, wobei man also nicht fokussieren kann, gehen nach einer gewissen Zeitspanne viele Granula optisch verloren. Man kann nur die verfolgen, die in der projizierten Bildebene verbleiben; das sind meist nur sehr wenige. In ihrer Anfangslage wurden jeweils sehr viele Granula festgelegt. Für die Meßergebnisse wurden nie mehr als 15, nie weniger als 8 Granula herangezogen und in einer Zelle gleichzeitig über eine Zeitspanne von 1 Min. (= 6 Teilbilder) beobachtet.

Wollte man also z. B. das RVM der GB während der gesamten Zellteilung ermitteln, so genügt es, die mittlere Verlagerung der Granula zueinander in bestimmten Zeitabständen zu messen. Dies geschah jeweils in Abständen von 2–3 Minuten. Es wurde also das RVM von der 1.–2., von der 3.–4., von der 6.–7. Minute usw. berechnet. Das Ergebnis, die mittlere Verlagerung der Granula zueinander, oder die Bewegungsintensität der Granula in diesen Zeiten, wurde im Koordinatensystem in Form einer Kurve festgehalten. Nur wenn die errechneten Werte zwischen zwei Messungen sehr unterschiedlich waren, wurde eine weitere Messung zwischen diese beiden Zeitabstände von 3 Minuten eingeschaltet. Für die einzelnen Messungen können alle Granula verwendet werden. Wesentlich ist, daß sie über einen Zeitraum von 1 Minute gut beobachtet und verfolgt werden können.

Gang der Auswertung: Er weicht von der Methode Schwöbels (1952) etwas ab. Man bezeichnet die Anfangslage des Granulum 1 mit 1, seine Endlage nach der Zeiteinheit von einer Minute mit 1'. Genau so verfährt man mit Granulum 2, 3, 4 usw. Nun mißt man mit einem Stechzirkel, um welchen Betrag der Abstand zwischen Granulum 1 und 1', 1 und 2, 1 und 2', 1 und 3 und 1 und 3' sich geändert hat. In gleicher Weise mißt man die Abstandsänderung zwischen Granulum 2 und 1 und 2 und 1', 2 und 2', 2 und 3 und 2 und 3' usw. In einer 3.-n-ten Reihe verfährt man ebenso, bis jedes Granulum der Ausgangsmeßpunkt des Meßverfahrens für die anderen gewesen ist. Die Differenzen der jeweils so erhaltenen Strecken addiert, ohne dabei Rücksicht darauf zu nehmen, ob sich dieser Abstand vergrößert oder verringert hat, und durch die Anzahl der bei der Messung beteiligten Granula dividiert, ergibt das RVM in der zugrundegelegten Zeiteinheit.

Der Vorteil der Bestimmung des RVM besteht darin, daß die die Eigenbewegungen der Granula überlagernden Drehbewegungen und Verschiebungen der Eizelle im perivitellinen Raum ausgeschaltet werden. Die scheinbaren Verlagerungen der Granula durch die störenden Eibewegungen dürfen dabei nicht wesentlich größer sein als ihre durch die „Eigenbewegungen“ hervorgerufenen Verlagerungen. An den meisten Eizellen wird diese Forderung erfüllt sein. Völlig ausgeschaltet werden dabei Drehbewegungen der Eizelle, die um eine mit der optischen Achse zusammenfallenden Drehachse erfolgen. Diese Drehbewegungen sind wohl die häufigsten. Eine Drehung um eine derartige Achse tritt oft bei zentrifugierten Eiern auf. Die Ursache ist ohne

Zweifel die nicht symmetrische Verteilung des geschichteten Ei-Inhalts von verschiedener spezifischer Schwere.

Ebenfalls vollkommen ausgeschaltet werden durch das RVM Verschiebungen in der Horizontalen nach jeder Seite. Liegt dagegen die Drehachse senkrecht zur optischen Achse, so ist die Ausschaltung keine vollständige, was auch der Fall ist, wenn beide einen Winkel von weniger als 90° bilden. Durch eine genügend große Anzahl von Einzelergebnissen wurden Ungenauigkeiten in der Bestimmung des RVM hinreichend ausgeglichen.

3. Meßergebnisse

W. Schwöbel (1952) untersuchte die Granulabewegung am gleichen Objekt im Stadium der Vorkernvereinigung. Hier werden die Messungen an ultrazentrifugierten Eizellen während der Teilung vorgenommen und mit der Intensität der Granulabewegung eines normalen, sich teilenden Eies verglichen.

a) Die Granulabewegung im nichtzentrifugierten Ei während der ersten Teilung

Die Kurven I, II, III in Abb. 5 stellen die Intensität der GB während der ersten Teilung in normalen Eiern dar. Sie wurden mit Hilfe des RVM alle 3 Minuten ermittelt (dies gilt auch für die folgenden Versuche). Im Durchschnitt werden dabei für die Objekte etwa 10 Granula für die Messung registriert. Die Teilungen verliefen bei Zimmertemperatur über eine Zeitspanne von 30 bis 35 Minuten. Die Intensität der Bewegung weist in allen drei Fällen einen deutlichen und sehr raschen Anstieg auf. Darauf folgt ein mehr oder minder starker und rascher Abfall der Kurven, ein weiterer Anstieg in allen drei Fällen und ein erneuter Abfall bei der Zelldurchschnürung. Bei einer Erweiterung des Kurvenbereiches auf die Zeit vor und nach der Teilung würden sich die Werte für das RVM ergeben, die nahe bei denen von Schwöbel (1952) ermittelten Werten von $0,3 \mu/\text{Min.}$ lägen. Die kleinen Unstimmigkeiten der Werte erklären sich daraus, daß Schwöbel nur bei konstanter Temperatur von $23,5^\circ \text{C}$ maß, während die Zimmertemperatur, bei der ich experimentierte, Schwankungen von $\pm 2^\circ \text{C}$ aufwies. Diese kleinen Temperaturunterschiede sind jedoch schon von Bedeutung. Auch die Eiggröße, die etwas variiert, kann für die Unregelmäßigkeiten der drei Kurven während der Teilung verantwortlich gemacht werden.

Daß die Temperatur einen großen Einfluß auf die Intensität der Granulabewegung während der Teilung hat, beweist die Kurve IV. Abgesehen davon, daß sich die Teilung über einen größeren Zeitraum, nämlich 45 Minuten, erstreckt, ergibt sich hier eine viel geringere Intensität der GB. Es werden zwar wieder zwei kleine Intensitätsmaxima, etwa bei der 15. und der 30. Minute erreicht, jedoch sind diese nicht so charakteristisch, wie dies bei den Messungen unter Zimmertemperatur der Fall ist.

Während der Messungen an normalen Eizellen fiel bald auf, daß in bestimmten Eibezirken von den Granula viel größere Wege zurückgelegt werden als in anderen Bezirken der Eizelle. Diese Zonen sind in

Abb. 6 schematisch dargestellt. Die Intensität der GB in diesen Zonen (errechneter Mittelwert aus drei Eizellen) stellt die Kurve V in Abb. 5 dar. Die

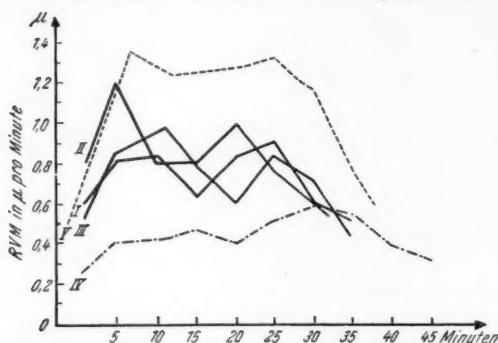


Abb. 5. Die Intensität der Granulabewegung im normalen Ei während der ersten Teilung. Kurven — bei Zimmertemperatur, Kurve - - - - bei einer Temperatur von etwa $+15^{\circ}\text{C}$. Kurve S_v - - - - Mittelwert der Granulabewegung aus den Randzonen der Eizellen I, II, III (siehe dazu Abb. 6).

Bewegungsintensität in diesen Eizonen nimmt von den Eipolen ausgehend zur Durchschnürrungsfurche hin kontinuierlich zu, die Bewegung ist aber keineswegs gerichtet (etwa mit kleinen Wirbelströmungen zu vergleichen) und häufig am deutlichsten in unmittelbarer Nähe der Einschnürrungsfurche im Laufbild bereits sichtbar. Es ist erstaunlich, daß die Werte bis auf eine Intensität von $1,4\mu$ RVM/Min. ansteigen.

Welche Ursache dies hat, inwieweit gegebenenfalls doch eine Strömung mitwirkt, soll jetzt nicht untersucht werden.

b) Die Granulabewegung im ultrazentrifugierten „geschichteten Ei“ während der ersten Teilung

Für die Intensität der GB scheinen drei Faktoren von Bedeutung zu sein.

1. Die Zentrifugierungsdauer.
2. Der Entwicklungszustand, in dem das Ei der Ultrazentrifugierung unterworfen wird und
3. Die Lage der Furchungsachse zur „Eischichtung“.

In Abb. 7 stellt die Kurve I und II die Intensität der GB bei Eizellen mit der Teilungsfurche senkrecht zur Schichtung dar (s. Abb. 4 a).

In I wurde das Ei etwa 30 Minuten vor der Teilung 10 Minuten lang

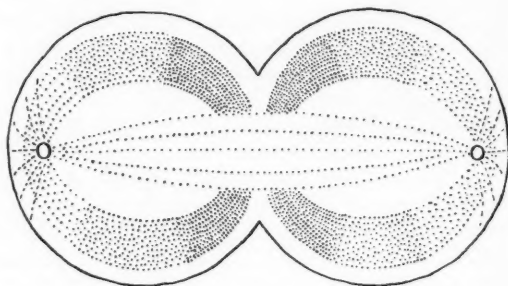


Abb. 6. Zonen verstärkter Granulabewegung während der Teilung der Eizelle. Die Intensität der Bewegung nimmt von den Eipolen zur Durchschnürrungsfurche hin zu, ist aber keineswegs gerichtet, so daß ein Vergleich mit dem von J. Spek (1916/18) angegebenen Teilungsschema hier nicht in Frage kommt. Je dichter die Punktierung, um so größer ist die Intensität der GB.

ultrazentrifugiert. Die Intensität der GB läßt sich in der schon stark aufgelockerten Schichtung der Eizelle während der Teilung, ungefähr mit der Granulabewegungsintensität eines normalen Eies vergleichen.

Anders ist es im Fall II. Hier wurde das Ei 30 Minuten lang bis etwa 20 Minuten vor seiner Teilung zentrifugiert. Die Schichtung war hier ausgeprägter und kompakter. Dies macht sich in der Intensität der GB während der Teilung der Zelle bemerkbar. Die Kurve steigt allmählich an; es wird nur ein Maximum erreicht. Sicher ist die ungleichmäßige Einschnürung in diesem Falle von Bedeutung. Dies soll jedoch erst im Zusammenhang mit dem Teilungsrhythmus näher untersucht werden.

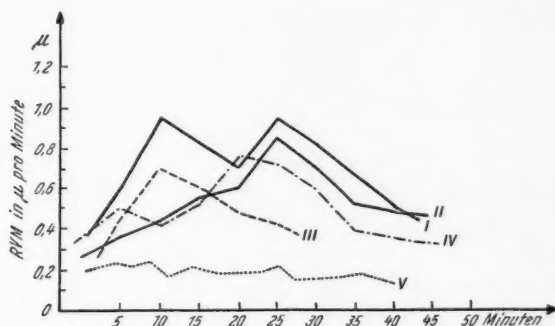


Abb. 7. Die Intensität der Granulabewegung im geschichteten ultrazentrifugierten Ei bei verschiedener Stellung der Furchungsachse zur Schichtung: I, II, III, IV. Vergleichsweise dazu die Bewegungsintensität der 0,1–0,3 μ großen, spezifisch schwersten Granula in einem geschichteten Ei während der ersten Teilung (Kurve V).

Die Kurve III wurde durch die Analyse einer schräg zur Schichtung erfolgten Teilung erzielt. Sie weist neben der Tatsache, daß für den Vorgang der Teilung nur eine Zeit von 28 Minuten benötigt wird, noch die Besonderheit auf, daß sie einen relativ steilen Anstieg und einen langsamen Abfall mit nur einem Intensitätsmaximum zeigt.

Wesentlich schwieriger ist die Erklärung der Kurve IV: Teilung parallel zur Schichtung. Eine Teilung parallel zur Schichtung wurde nur in sehr wenigen Ausnahmefällen beobachtet; meist platzte der Keim, wie noch ausgeführt wird. Bemerkenswert sind die lange Zeit für die Teilung (47 Minuten) und die ungleichen Maxima (etwa bei der 5. und der 20. Minute) für die Bewegungsintensität der Granula.

Kurve V in Abb. 7 stellt die Bewegungsintensität der spezifisch schwersten Granula in der Eizelle während der ersten Teilung dar. Diese Art der Bewegung dürfte am ehesten mit der Brownschen Molekularbewegung zu vergleichen sein (im Zeitrasterlaufbild erscheint die Bewegung dieser kleinen Granula der Brownschen Molekularbewegung am ähnlichsten).

c) Die Granulabewegung im ultrazentrifugierten „Ball-Ei“ während der ersten Teilung

Zentrifugiert man *Parascaris*-Eier auf einem bestimmten Entwicklungszustand, so erreicht man, daß die spezifisch leichtesten, $1\ \mu$ großen Granula in Form eines Balles aus der Eizelle heraustreten und, sofern es der Teilungsablauf erlaubt, wieder „zurückwandern“ können. Abb. 8 stellt Intensitätsmessungen der GB bei „zurückwandernden“ Granula während der ersten Teilung dar.

Wenn das Wort „zurückwandern“ hier gebraucht wird, so sei betont, daß es sich keineswegs um eine aktive Bewegungsform der

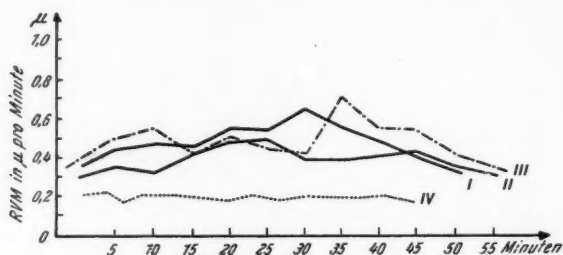


Abb. 8. Intensität der Granulabewegung während der ersten Teilung. I und II: Nur wenige Granula können noch „zurückwandern“. III: Der Ball wird ganz von einer Tochterzelle aufgenommen. IV: Bewegungsverlauf der kleinen, spezifisch schwersten Granula.

Granula zu handeln braucht. Die Frage „wer wen bewegt“ soll zunächst nicht behandelt werden.

Kurve I und II geben die Meßergebnisse der GB wieder, wobei die Bälle in der Furchungsachse liegen. Die Teilung schreitet schneller voran als die Rückwanderung der Granula in die Eizelle; so geschieht es, daß die beiden Tochterzellen nur wenige Granula erhalten, während der Rest in Form eines Balles außerhalb der Zellen bleibt. Charakteristisch für beide Beobachtungen ist:

- a) Die Teilungsvorgänge erstrecken sich über Zeiträume von 52 bzw. 56 Minuten.
- b) Die Granula legen keine so großen Wegstrecken zurück.
- c) Es fehlen die ausgeprägten Maxima wie sie in den vorherigen Versuchen auftreten.

In der Darstellung der Kurve III dagegen wird der Ball von nur einer Tochterzelle wieder völlig aufgenommen. Hier treten, im Gegensatz zu früher, wieder deutlicher die zwei Maxima etwa bei der 10. und der 35. Minute auf.

Kurve IV gibt die Bewegungsintensität der spezifisch schwersten Granula noch einmal wieder, wie es in Abb. 7 durch Kurve V bereits geschehen ist. Der Verlauf beider Kurven stimmt gut überein.

d) Beobachtungen zur Entstehung von „Ball-Eiern“

Bemerkenswerterweise ist für die „Ballbildung“ oder „Ballabspaltung“ die Zeitdauer der Ultrazentrifugierung nicht allein maßgebend. Der je-

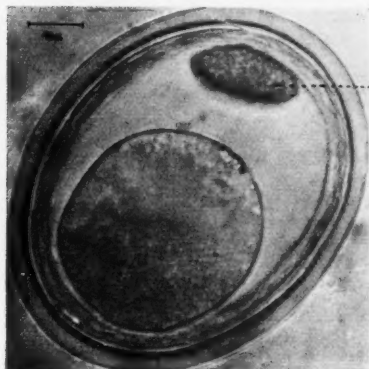


Abb. 9.

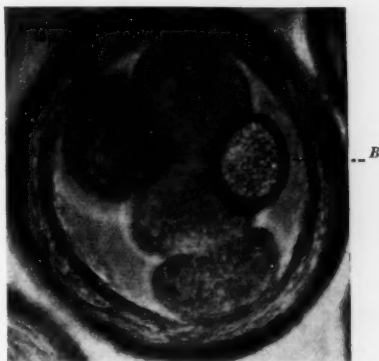


Abb. 10.

Abb. 9. Abzentrifugierter Ball (B). Zentrifugierungsdauer 10 Min. (Umdrehungszahl etwa 2500/sec.).

Abb. 10. Das gleiche Ei wie in Abb. 9 am nächsten Tag.



Abb. 11.



Abb. 12.

Abb. 11. 1 Stunde nach Entnahme aus dem Kühlschrank; 3 Stunden lang ultrazentrifugiertes Ei (Umdrehungszahl etwa 2500/sec.).

Abb. 12. 2 Stunden nach Entnahme aus dem Kühlschrank; 2,5 Stunden lang zentrifugiertes Ei (Umdrehungszahl etwa 2500/sec.).

weilige Entwicklungszustand der Eizelle, in der sie sich beim Aussetzen der Wirkung der erhöhten Schwerkraft befindet, ist für die „Form“, die das Ei nach Entnahme aus der Zentrifuge hat, verantwortlich.

Der Zeitraum, in dem ein Ball (dies gilt besonders für das Einzellenstadium), von der Eizelle abzentrifugiert werden kann, ist relativ klein. Er fällt in die Zeit 15 Minuten vor der Teilung bis zum Teilungsbeginn. Zentrifugiert man also Eizellen kurz vor ihrer Teilung, so genügen wenige Minuten, um den Granulaball aus dem Einzellenstadium abzutrennen. Dadurch werden Behauptungen in älteren Arbeiten, z. B. von Th. Boveri und M. J. Hogue, verständlich, die besagen, daß der Granulaball überhaupt nicht oder nur in seltenen Einzelfällen, die bestimmt Ausnahmen darstellen,

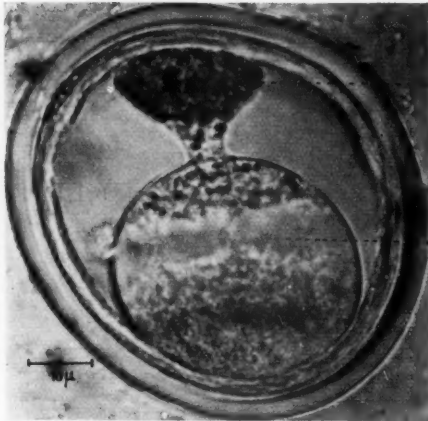


Abb. 13.

Abb. 13. 90 Minuten ultrazentrifugiertes Ei vor der Vorkernvereinigung. Umdrehungszahl etwa 2500/sec. S = Stielball, V = Vorkerne (aus dem Laufbild).

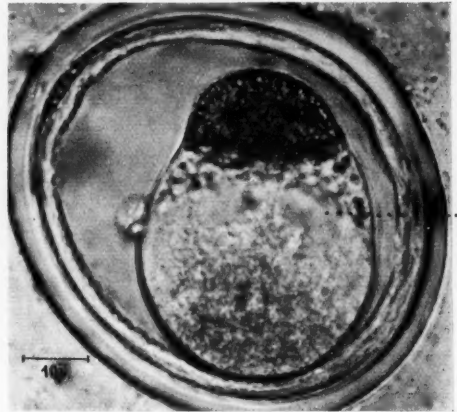


Abb. 14.

Abb. 14. Das gleiche Ei wie in Abb. 13; 40 Minuten nach Entnahme aus der Ultrazentrifuge. V = Vorkerne (aus dem Laufbild).

aus dem Einzellenstadium losgelöst werden kann. Wie noch auszuführen sein wird, ist das *Parascaris*-Ei in seinen verschiedenen Entwicklungsphasen bis zur ersten Teilung beträchtlichen Viskositätsschwankungen unterworfen. Diese Tatsache muß mit der Möglichkeit des Abzentrifugierens von Zytoplasmamaterialien in dieser kurzen Zeitspanne unmittelbar vor der Teilung in Zusammenhang gebracht werden. Im Zwei- oder Mehrzellenstadium ist das Abzentrifugieren von Granulabällen leichter möglich.

Die Abb. 9 und 10 sind Beispiele dafür, daß der Granulaball aus dem Einzellenstadium entfernt werden kann. Es genügt eine Ultrazentrifugierungsdauer von 10 Minuten. 5 Minuten nach Entnahme aus der Zentrifuge setzte die Teilung ein. Am nächsten Tag hatte das Ei sich zu einem normalen T-Stadium weiterentwickelt.

Anders liegen die Verhältnisse bei Eiern, die man auf dem Stadium vor der Vorkernvereinigung der verstärkten Schwerkraft aussetzt. Die Ultrazentrifugierung kann hier über einen Zeitraum von mehreren Stun-

den ausgedehnt werden, ohne daß eine Absonderung der Granula in Ballform auftritt. Überschreitet man die hier angegebenen Zeiten von zweieinhalb bis drei Stunden, so tritt eine deutliche Schädigung ein, die sich entweder bei der erneuten Annahme der Kugelgestalt des Eies bemerkbar macht, oder es zeigt sich bei der Entwicklung, daß der Keim irreversibel geschädigt ist. Nicht selten wird durch sehr langes Ultrazentrifugieren auf diesem Entwicklungsstadium ein Platzen der Zelle hervorgerufen. Die verschiedenen Zelleinschlüsse liegen dann regellos im perivitellinen Raum (s. Abb. 47).

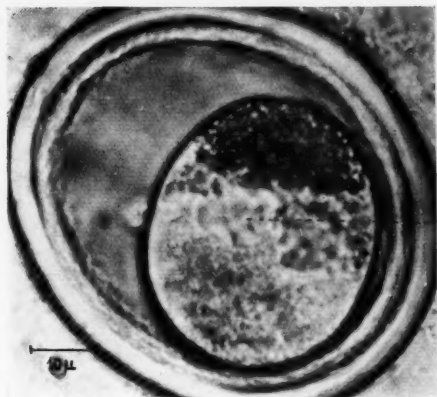


Abb. 15.

Abb. 15. Das gleiche Ei wie in Abb. 13; etwa 100 Minuten nach der Entnahme aus der Ultrazentrifuge. V = Vorkerne (aus dem Laufbild).

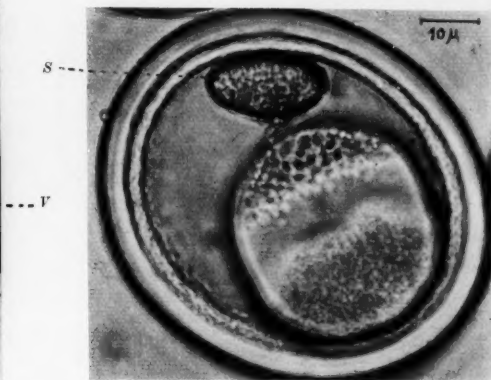


Abb. 16.

Abb. 16. 1 Stunde lang ultrazentrifugiertes Ei während der Vorkernvereinigung (Umdrehungszahl etwa 2500/sec). S = Stielball (aus dem Laufbild).

Ultrazentrifugiert man ein *Parascaris*-Ei kurz vor der Vorkernvereinigung eine Stunde lang, wie in Abb. 13, so werden zwar die Granula abgesondert und geschichtet, sie bleiben aber noch durch einen dicken Stiel mit der Eizelle verbunden. Innerhalb von zwei Stunden gelangt der „Stielball“ wieder in die Eizelle zurück, die von neuem Kugelgestalt annimmt. Erst nachdem eine Zeitlang ein Austausch von Zytoplasmainschlüssen stattgefunden hat, setzt die Vorkernvereinigung und nach kurzer Zeit die Zellteilung ein. Dieser zeitliche Abstand zwischen Vorkernvereinigung und Teilung kann allerdings in derartigen Fällen den bei einer normalen Zelle um viele Stunden übersteigen.

Die in den Abb. 16–18 dargestellte Eizelle wurde eine Stunde lang während der Vorkernvereinigung ultrazentrifugiert. Der herausgetretene Ball stand nur noch durch einen Stiel mit der Eizelle in Verbindung. Das Einziehen des Granulaballes begann auch hier sofort und war nach zwei Stunden abgeschlossen. Die darauffolgende Teilung wurde, wenn auch nicht so lange, wie das im vorherigen Beispiel der Fall war, verzögert;

der Zeitraum war aber erheblich größer, als der zwischen Vorkernvereinigung und Teilung einer normalen Zelle.

Diese Beispiele sollen zum Verständnis der folgenden Teilbildanalyse der verschiedenen Intensität der Granulabewegung dienen.

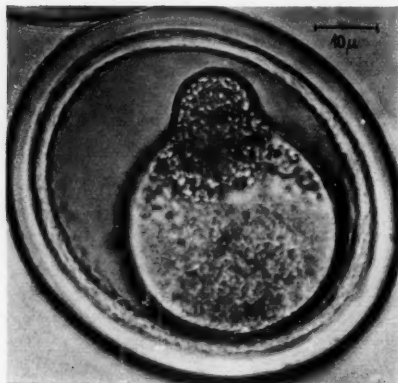


Abb. 17.

Abb. 17. Das gleiche Ei wie in Abb. 16; 50 Min. nach Entnahme aus der Ultrazentrifuge. Der Ball wird wieder eingezogen.

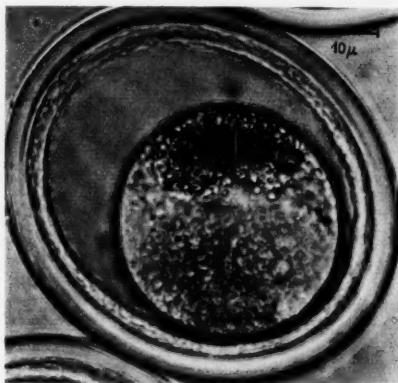


Abb. 18.

Abb. 18. Das gleiche Ei wie in Abb. 16; 2 Stunden nach Entnahme aus der Ultrazentrifuge.

e) Die Granulabewegung in verschiedenen Stadien der Ultrazentrifugierung vor oder nach der ersten Teilung

Im Gegensatz zu den früheren Intensitätsmessungen der Bewegung der Granula, die während der Teilung erfolgten, werden ergänzend dazu

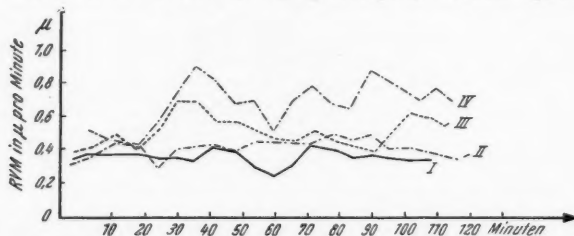


Abb. 19. Die Intensität der Granulabewegung in ultrazentrifugierten Eizellen vor und nach der ersten Teilung (Erklärung der Kurven im Text).

Messungen an Eiern vorgenommen, die meist sehr lange ultrazentrifugiert wurden, sich aber nicht teilten.

Die Kurve I in Abb. 19 stellt die Intensitätsschwankungen der GB in einem Ei dar, das 90 Minuten lang vor der Vorkernvereinigung zentrifugiert

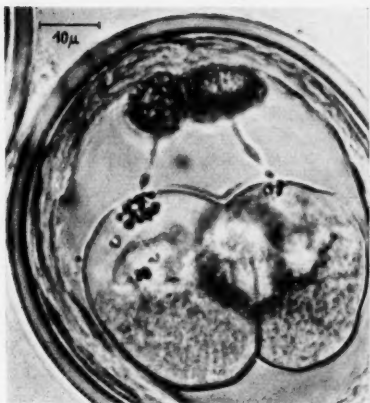


Abb. 20.

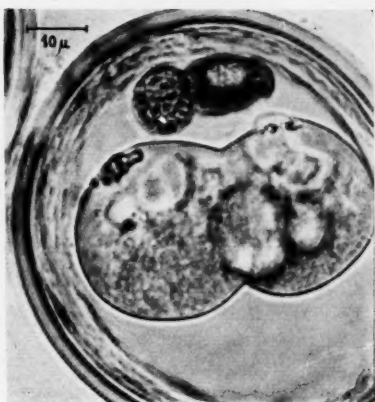


Abb. 21.

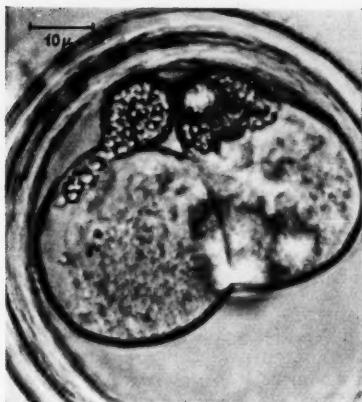


Abb. 22.

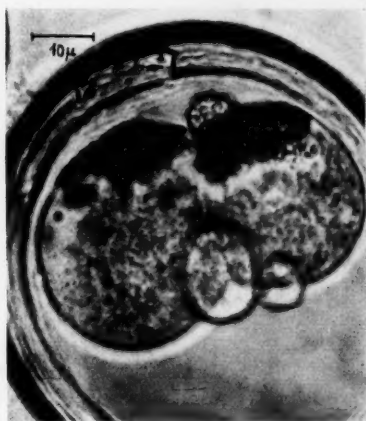


Abb. 23.



Abb. 24.

Abb. 20. 20 Minuten lang ultrazentrifugiertes Zweizellenstadium mit zwei Stielbällen (Umdrehungszahl etwa 2500/sec). Aus dem Laufbild.

Abb. 21. Das gleiche Ei wie in Abb. 20; 10 Minuten später.

Abb. 22. Das gleiche Ei wie in Abb. 20 und 21; 40 Min. später als Abb. 20.

Abb. 23. Das gleiche Ei wie in Abb. 20, 21 und 22; 70 Min. später als Abb. 20.

Abb. 24. Das gleiche Ei wie in Abb. 20, 21, 22 und 23; 24 Stunden nach Abb. 20.

wurde und einen dicken Stielball aufwies. Die Einziehung des Stielballes in die Eizelle dauerte bis zur völligen Abrundung des Eies 110 Minuten. Aus der Kurve kann man, abgesehen von einem deutlichen Minimum bei der 60. Minute, von kleineren Schwankungen abgesehen, eine relativ gleichmäßige Intensität der GB ablesen. Ähnliches trifft für die Kurve II zu. Hier handelt es sich um ein Ei, das 1 Stunde lang unmittelbar vor der Vorkernvereinigung ultrazentrifugiert wurde (s. auch Abb. 16—18).

Eine wesentlich andere Gestalt weist dagegen Kurve III auf. Die Meßwerte stammen von einem Ei, das während der Vorkernvereinigung 1 Stunde lang ultrazentrifugiert wurde und einen engen Stielball aufwies. Das erste Maximum der Kurve kann auf das rasche Einziehen des Stielballes und der

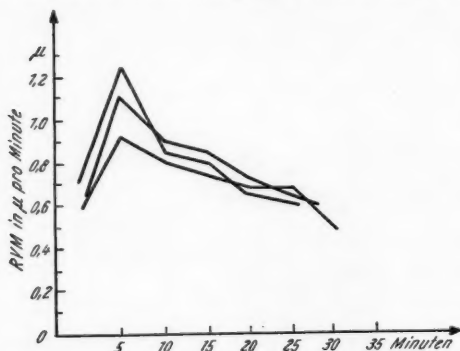


Abb. 25. Intensität der Granulabewegung im Einzellenstadium mit abzentrifugiertem Ball (Umdrehungszahl etwa 2500/sec).

damit verbundenen schnelleren Verlagerung der Granula in Verbindung gebracht werden. Das 2. Maximum weist dagegen schon auf eine Viskositätsänderung und eine damit verbundene Intensivierung der passiven Bewegung der Granula hin.

Bei der Kurve IV handelt es sich um die Meßergebnisse an einem auf dem Zweizellenstadium

20 Minuten lang zentrifugierten Ei, das zwei deutliche Stielbälle aufwies. Man kann erkennen, daß

die Intensität der GB auf diesem Stadium der Entwicklung viel größer ist, als in den drei anderen Fällen.

Die Teilbildanalyse zeigt eine sehr rasche Rückbildung der Stielbälle, während die eigentliche „Einziehung“ der Bälle in die Eizelle offensichtlich eine größere Zeitspanne benötigt.

Nach etwa 24 Stunden hat sich das Ei noch einmal geteilt. Obwohl der Entwicklungsablauf pathologisch zu werden schien, wurde das Ei weiter beobachtet. Nach einer Woche war ein völlig normaler Embryo entstanden, der lediglich ein kleines Granulabällchen aufwies, das in Abb. 23 zu erkennen ist.

f) Die Granulabewegung in Einzellenstadien während der ersten Teilung mit abzentrifugiertem „Ball“

Trotz des Abzentrifugierens eines „Balles“ bleiben noch genügend 1μ große Granula in der Zelle zurück, so daß eine Intensitätsmessung ihrer Bewegungen möglich ist. In Abb. 25 sind drei derartige Beispiele graphisch dargestellt.

In allen drei Fällen kann man ein charakteristisches, zeitlich sehr

frühes Maximum der Bewegungsintensität der Granula etwa während der Anaphase erkennen. Zwischen der 4.—5. Minute legen die 1μ großen, noch in der Zelle verbliebenen Granula Wegstrecken zurück, die die $1,2\mu$ -Grenze teilweise überschreiten.

Es ist bewiesen, daß die wenigen in der Zelle verbliebenen Granula jetzt eine erheblich größere „Bewegungsmöglichkeit“ in der Zelle haben (q = Cunningham-Faktor; die Lagerungsdichte spielt danach eine große Rolle). Dies kommt durch die noch relativ hohe Intensität der Granulabewegung von etwa $0,7\mu/\text{Min.}$ bei der Durchschnürung der Zelle zum Ausdruck. Die Granula lassen sich in diesen Fällen über längere Zeiten identifizieren und messend verfolgen.

Bei allen ultrazentrifugierten Eizellen wurden zur Bestimmung des RVM jeweils auch 2—3 der kleinen, spezifisch schwersten Granula herangezogen. Ihr RVM dient als Vergleichsbasis für die Messungen der GB aus den übrigen Eibezirken.

V. Der Teilungsrhythmus des *Parascaris*-Eies unter Zeitraffung

Im folgenden Abschnitt soll an normalen und ultrazentrifugierten Eizellen der Teilungsablauf, vor allem die Bildung der Einschnürungsfurche, einer Analyse unterzogen werden.

In der neuen Literatur hat sich immer mehr die Meinung durchgesetzt, daß die eindrucksvollen Modellversuche von Bělař (1926) und Spek (1918) an Öltropfen, die die Zellteilung auf Grund von Änderungen der Oberflächenspannung „erklären“ sollten, nicht als die einzigen für die Teilung verantwortlichen Komponenten anzusehen sind, vielmehr ist es so, daß der Teilungsvorgang auch noch andere, ebenso wichtige Ursachen haben muß. So sagt z. B. A. Kühn (1955) u. a.: „Den Erklärungswert der Ähnlichkeit zwischen dem Verhalten der Zellen und dem des Öltropfenmodells dürfen wir nicht zu hoch veranschlagen: Oberflächenspannungen einer flüssigen Grenzschicht dürfen wir für die Zellteilung jedenfalls nicht in Rechnung stellen. Die Zytoplasmaströmungen finden unter einer gelatinösen Rindenschicht statt; und in der Zellteilung wirken mehrere Faktoren zusammen, die wir bislang erst aus den Veränderungen physikalischer Zustände des Zytoplasma erschließen können.“

Ob und inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Intensität der GB und der Bildung der Furche bei der Zellteilung besteht, sollen die folgenden Versuche zeigen.

1. Messende Analyse der Bildung der Teilungsfurche

Den Einschnürungsverlauf in seinen Phasen exakt zu messen, ist nicht einfach. Voraussetzung ist, daß die im Teilbild sichtbare Ebene der Durchschnürung mit der Bildebene während der Messungen genau übereinstimmt. Dies ist leider nicht häufig der Fall, besonders dann nicht, wenn der Teilungsbeginn gleichzeitig beobachtet werden soll und die Einschnürung an beiden Seiten noch nicht zu erkennen ist. Es mußte daher eine große Anzahl

von Zellen in Teilung unter Zeitraffung aufgenommen werden. Der Versuch wurde abgebrochen, wenn diese Voraussetzungen nicht mehr erfüllt waren. In den meisten Fällen drehte sich das Ei nicht um eine in der Bildebene liegenden, sondern senkrecht zu ihr stehenden Achse, wie bereits bei der Granulabewegung erwähnt wurde. Diese Drehbewegung konnte bei dem angewandten Meßverfahren ausgeschaltet werden.

Das Ausmessen der zurückgelegten „Strecken“ der Furche geschah derart, daß man in Abständen von 2–3 Minuten die aus der Teilbildanalyse erhaltene Darstellung des Einschnürungsverlaufes weiter verfolgte. Die Endlagen der jeweiligen, am tiefsten „vorgedungenen“ Teile der Furche („ground of the furrow“) wurden auf einer Achse markiert, die als Grundlage für die Eintragung weiterer Einschnürungswerte diente.

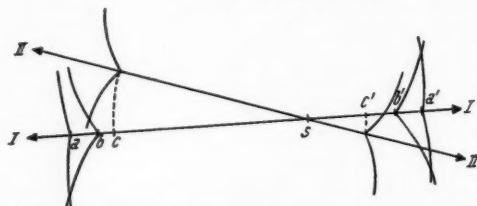


Abb. 26. Achsendrehung bei Bestimmung der Einschnürungswerte (Erklärung im Text).

Beim Zeichnen der auf Transparentpapier jeweils dargestellten sechs Teilbilder bildete immer das letzte Teilbild das erste für die nächste Serie; der Ablauf der Furchenbildung war somit genau zu verfolgen. Liegen die Furchungsachsen nicht mehr

aufeinander, wie dies durch Achse I in Abb. 26 dargestellt ist, so genügt es, mit einem Zirkel vom Schnittpunkt der beiden Achsen s (= Teilungsfurche) den neuen Einschnürungswert von Achse II auf I zu bringen. In der Abb. 26 sind diese Werte durch c bzw. c' angegeben; sie wurden von Achse II auf Achse I übertragen.

2. Meßergebnisse

Der Einschnürungsablauf wird zunächst an normalen und durch Wärme beeinflussten Eizellen untersucht; es folgen Beobachtungen an ultrazentrifugierten Eizellen.

a) Die Bildung der Teilungsfurche in nichtzentrifugierten Eiern bei Zimmertemperatur

Abb. 27 zeigt die Bildung der Teilungsfurche an zwei normalen Eizellen. Es handelt sich um zwei Keime mit einem relativ großen Durchmesser: 43μ und 45μ . Der Vorgang der Durchschnürung dauerte in einem Fall 30, im anderen Fall 31 Minuten. Auffallend ist, daß der Einschnürungsablauf nicht kontinuierlich, sondern ruckartig (unter Zeitraffung) erfolgt. Besonders in der ersten Hälfte des Teilungsvorganges werden vielfach unregelmäßige und kleinere Einschnürungswegstrecken zurückgelegt, während in der zweiten Hälfte meist gleiche und größere Einschnürungswege in gleichen Zeiten wie vorher erreicht werden. Die Durchschnürung endet bei beiden Zellen etwa in der Mitte. Dies wird schon jetzt hervorgehoben, da bei zentrifugiertem Eimaterial ein anderes Verhalten festgestellt wurde.

b) Die Bildung der Teilungsfurche an Eizellen bei verschiedener Temperatur

Daß die Temperatur den Ablauf der Teilung wesentlich beeinflussen kann, wird in zwei Beispielen dargestellt: Abb. 28. Die ausgezogene Kurve zeigt die Verhältnisse bei einem Ei, das bis kurz vor der Teilung einer Temperatur von $+32^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt war; während im anderen Falle ——— das Ei bis zum Teilungsbeginn einer Temperatur von $+15^{\circ}\text{C}$ unterworfen

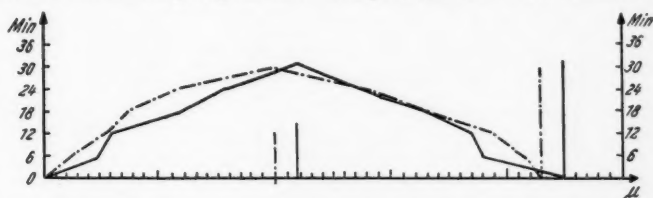


Abb. 27. Die Bildung der Teilungsfurche zweier normaler Eizellen von *Parascaris equorum* bei Zimmertemperatur. Abszisse: Eidurchmesser (ein Teilstrich = 1μ). Die Einschnürung in der projizierten Bildebene beginnt von zwei Seiten nach der Mitte. Ordinate: Zeit. Der Schnittpunkt von errichteten Senkrechten auf Abszisse und Ordinate gibt zur jeweiligen Zeit den Weg der Teilungsfurche an. Das „Maximum“ der Kurve entspricht dem Zeitpunkt der Vollendung der Teilung. Die Kurven stellen somit das Vordringen der Teilungsfurche für jeden Zeitpunkt der Beobachtung dar. Die Fußpunkte der errichteten senkrechten Linien im rechten Teil der Abbildungen geben den Eidurchmesser, die in der Mitte den Durchschnürungsabschluß von der linken Eiperipherie an.

war. Trotz der verschiedenen Durchmesser, erste Zelle 41μ , zweite Zelle 45μ , kann man deutlich erkennen, daß die Dauer der Teilung der ersten Zelle 24 Minuten, die der zweiten 39 Minuten beträgt. Es liegt hier also

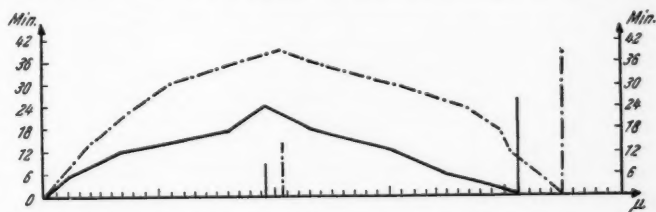


Abb. 28. Die Bildung der Teilungsfurche von zwei normalen Eizellen: ——— Temperatur vor der Teilung $+32^{\circ}\text{C}$; ——— Temperatur vor der Teilung $+15^{\circ}\text{C}$. Abszisse: Eidurchmesser; 1 Teilungsstrich = 1μ . Ordinate: Zeit.

eine zeitliche Differenz von 15 Minuten vor. Die Bildung der Teilungsfurche verläuft beim Ei, das erhöhter Temperatur ausgesetzt war, kontinuierlich. Von geringen Schwankungen abgesehen, werden zu jedem Zeitpunkt der Einschnürung gleiche Wegstrecken der Teilungsfurche zurückgelegt. Die Temperaturerhöhung hat sich also für die Teilung als beschleunigender Faktor erwiesen. Im „untertemperierten Ei“ dagegen dauert die Durchschnürung 1. längere Zeit (39 Min., gegenüber

24 Min.) und 2. sind die zurückgelegten Einschnürungswege verschieden. Zu Beginn der Teilung sind die Wege der Furche klein, während sie dann allmählich größer werden.

c) Die Bildung der Teilungsfurche senkrecht zur Schichtung im ultrazentrifugierten Ei

Vorversuche zeigten bereits deutlich, daß der Vorgang der Durchschnürung der Eizelle durch Ultrazentrifugierung wesentlich beeinflusst werden kann. Abb. 29 gibt vier Beispiele für derartige Versuche. In allen vier Fällen sind die Eizellen mehr oder minder deutlich durch Ultrazentrifugierung geschichtet. Ihre Furchungsachsen — Verbindungslinien der „grounds of the furrows“ — stehen senkrecht zur Schichtung.

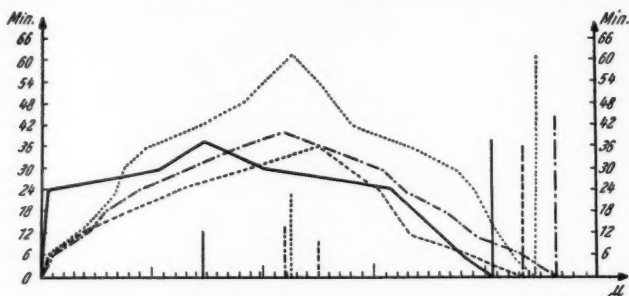


Abb. 29. Die Bildung der Teilungsfurche in „geschichteten Eizellen“. Die Teilungsebene liegt senkrecht zur Zentrifugierungsschichtung. Abszisse: Eizellendurchmesser (1 Teilstrich = 1μ). Ordinate: Zeit.

Im ersten Falle (— Kurve) liegt eine Eizelle vor, die 30 Minuten lang zentrifugiert wurde. Die Teilung setzte 25 Minuten nach Entnahme aus der Ultrazentrifuge ein. Bei Teilungsbeginn war die Schichtung noch deutlich ausgeprägt und kompakt. Die Bildung der Teilungsfurche ging sehr unregelmäßig vor sich; die 1μ großen Granula (Abb. 29, — Kurve, linke Bildseite) setzten der Einschnürung bis zur 24. Minute Widerstand entgegen, die Furchung wird gehemmt. Die Einschnürungsfurche der „anderen Seite“ (im Bild rechts) der „Zone“ der kleinen, spezifisch schwersten Granula, hatte bis zu dieser Zeit (bis zur 24. Min.) schon eine Wegstrecke von 10μ zurückgelegt. Nach der 24. Minute ändern sich jedoch diese Verhältnisse.

In einer relativ kurzen Zeit (etwa 3 Minuten) werden Einschnürungswege, die die 10μ -Grenze auf beiden Seiten überschreiten, zurückgelegt. Die weitere Teilung verlief normal. Die gesamte Teilung dauerte 37 Minuten. Die Einschnürungswege an beiden Seiten des projizierten Bildes waren verschieden (15 und 25μ in Abb. 29, — Kurve).

Die nächsten beiden Kurven (--- Kurve) zeigen den Teilungsablauf zweier Zellen, die nur 10 Minuten lang zentrifugiert wurden. Die Schichtung war daher noch nicht so kompakt wie im vorherigen Beispiel. Die Teilung setzte 15 Minuten nach der Zentrifugierung ein. Abgesehen von eini-

gen Unregelmäßigkeiten in der ersten Hälfte des Teilungsablaufes, ist der Verlauf normal. Der Grund für die langen Zeiten liegt wohl darin, daß in beiden Eizellen der Durchmesser um 5μ und 5μ größer ist als beim ersten Beispiel.

Völlig anders verhält sich eine Eizelle, die zwar nur 15 Minuten lang ultrazentrifugiert wurde, deren Teilung jedoch sofort nach Entnahme aus der Ultrazentrifuge einsetzte. Die punktierte Kurve in Abb. 29 zeigt ein solches Beispiel. In dieser Zelle wurde bereits in der Ultrazentrifuge die Teilungsspindel ausgebildet. Der Einschnürungsverlauf auf beiden Seiten der Eizelle ist zwar gleichmäßig, jedoch dauert die Teilung 61 Minuten, das ist die doppelte Zeit eines normalen Teilungsvorganges.

d) Die Bildung der Teilungsfurche parallel und schräg zur Schichtung im ultrazentrifugierten Ei

Während in den bisher geschilderten Versuchen die Teilungsfurche relativ kontinuierlich ausgebildet wurde, ist dies in ultrazentrifugierten

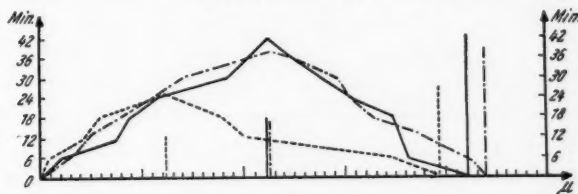


Abb. 50. Der Teilungsablauf von geschichteten, ultrazentrifugierten Eizellen. Teilungsablauf parallel — und schräg zur Eischichtung. Abszisse: Eidurchmesser (1 Teilstrich = 1μ). Ordinate: Zeit.

Eizellen mit Teilungsebene parallel und schräg zur Schichtung nicht der Fall. Die ausgezogene Kurve in Abb. 50 stellt eine Teilung parallel zur Schichtung dar. Wenn das Wort „parallel“ hier gebraucht wird, so ist dies nicht mathematisch zu verstehen, da eine Teilung genau parallel zur Schichtung, wie noch berichtet wird, im *Parascaris*-Ei nicht möglich ist. Die Teilung im vorliegenden Versuch verlief also nahezu parallel zur Schichtung.

Die Eizelle wurde 10 Minuten lang ultrazentrifugiert. Die Teilung begann sofort nach Entnahme aus der Ultrazentrifuge. Wahrscheinlich war die Teilungsspindel schon in Ausbildung begriffen, als das Ei der erhöhten Schwerkraft ausgesetzt wurde. Die Zelle wies eine deutliche Schichtung auf; beim Einsetzen der Teilung wurden die Granula jedoch in ihrer Gesamtheit auffällig verlagert. Sie wurden aus ihrer ursprünglichen Pol-Lage nach der Seite abgedrängt. Die Teilung dauerte 42 Minuten; sie verlief im Anfang sehr langsam, und wenn wir die Einschnürungswege „beider Seiten“ — in der graphischen Darstellung betrachten, so sind diese sehr verschieden. Erst von der 24. Minute an, war der Verlauf der Einschnürung gleichmäßig, die Anfangsschwierigkeit also überwunden.

Die beiden anderen Beispiele der Abb. 50 stellen den Furchungsablauf von Eizellen dar, die sich schräg zur Schichtung teilten.

Die - - - - - Linie gibt den Durchschnürungsablauf einer Zelle wieder, die 20 Minuten lang ultrazentrifugiert wurde. Die Teilung setzte 15 Minuten nach der Zentrifugierung ein. Die andere Eizelle (----) wurde nur 10 Minuten ultrazentrifugiert, teilte sich aber sofort nach der Entnahme aus der Zentrifuge. Im ersten Fall (- - - - -) verlief die Teilungsfurche derart, daß beide Tochterzellen noch einige Granula erhielten; im zweiten Beispiel hingegen gelangten die Granula sämtlich in eine Tochterzelle. Die Bildung der Teilungsfurche verlief daher bei beiden Eizellen verschieden. Sie dauerte im ersten Falle 38, im zweiten nur 26 Minuten.

Für das zweite Beispiel (----) ist der Unterschied der zurückgelegten Teilungswege der Einschnürungsfurchen „beider

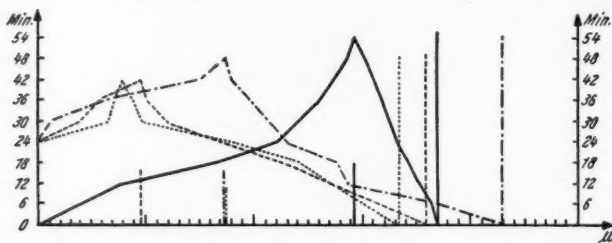


Abb. 31. Die Bildung der Teilungsfurche bei ultrazentrifugierten Eizellen mit Granulabällen, die eine verschiedene Lage zur Furchungsachse (siehe Abb. 26) einnehmen. Abszisse: Eidurchmesser (1 Teilstrich = 1 μ). Ordinate: Zeit.

Seiten“ auffallend. Während die Einschnürungsfurche, die deutlich von der Seite der spezifisch schwersten, kleinen Granula einschneidet, eine Wegstrecke von 27 μ zurücklegt, erreicht die „andere Seite“ bis zur Durchschnürung nur eine Wegstrecke von 12 μ . Die 1 μ großen Granula setzen also der Einschnürung infolge ihrer Anordnung Widerstand entgegen.

e) Die Bildung der Teilungsfurche bei „Ball-Eiern“

Bei den folgenden vier Teilbildanalysen sind für den Teilungsablauf zwei Tatsachen von Bedeutung: 1. die Lage des Balles zur „Furchungsachse“ (siehe Abb. 26) und 2. die Zeit, in der noch Granula während des Teilungsablaufes aus den Bällen rückverlagert werden können. Liegt der Granulaball nicht in der „Furchungsachse“, so setzt er, wie Abb. 31 - - - - - zeigt, der Einschnürung auf seiner Seite Widerstand entgegen. Dieser wird erst 24 Minuten nach Teilungsbeginn überwunden. Dies ist der Zeitpunkt, in dem die Granula in eine Tochterzelle zurückgelangen können. Der Einschnürungsablauf der „anderen Seite“ (in der Abb. 31) wird von der 12.—18. Minute ab ebenfalls gehemmt.

Anders ist es bei den übrigen Fällen der Abb. 31. Liegt der Granulaball in der Furchungsachse, und werden nur wenige Granula in die Tochterzellen rückverlagert, so kann die Bildung der Furche auf „beiden Seiten“ (des Projektionsbildes) gleichzeitig einsetzen; die Einschnürung beginnt jedoch sehr langsam auf der Seite — rechte Seite des Projektionsbildes —

Kurve —, auf der der Ball liegt, während sie auf der anderen Seite — linke Seite des Projektionsbildes — bis zur 24. Minute eine Wegstrecke über $22\ \mu$ zurücklegt. Der gesamte Teilungsablauf dauert 54 Minuten.

Wahrscheinlich rührt dies daher, daß der Ball, obwohl er bereits durch eine „Membran“ von den beiden Tochterzellen getrennt ist, sich in die Teilungsfurche passiv hineinzwängt und die Einschnürung auf der einen Seite — rechter Kurventeil des Projektionsbildes — verzögert.

Gelangen viele abzentrifugierte Granula in die sich teilende Zelle, bis 25 Minuten nach Teilungsbeginn (siehe die Kurven: - - - -, in Abb. 31), so wird die Zeit des Teilungsablaufes kürzer (42 Min.), weil der jetzt erheblich kleinere Ball dem Einschnürungsablauf keinen so großen Widerstand mehr entgegensetzt. Die Einschnürung der „Ballseite“ (im

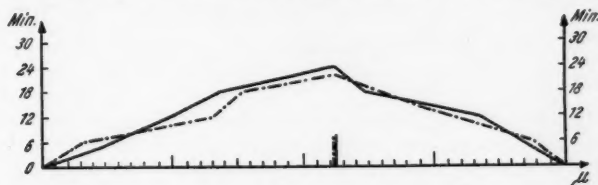


Abb. 32. Die Bildung der Teilungsfurche von ultrazentrifugierten Eizellen. Eine der beiden Tochterzellen erhält fast alle Granula. Abszisse: Eidurchmesser (1 Teilstrich = $1\ \mu$). Ordinate: Zeit.

Projektionsbild) setzt erst dann ein, wenn die Granula nicht mehr in eine der beiden Tochterzellen zurückgelangen können (siehe das Zeitrafferlaufbild).

f) Die Bildung der Teilungsfurche bei ultrazentrifugierten Eizellen mit ungleichmäßiger Granulaverteilung

Alle bisher betrachteten, aus der Teilbildanalyse gewonnenen graphischen Darstellungen, besonders die am ultrazentrifugierten Eimaterial erhaltenen, lassen erkennen, daß die Granula, ob sie nun in Form eines Balles oder auch nur geschichtet vorliegen, die Einschnürung der Eizelle hemmen. Noch deutlicher wird dies an Eizellen, die ultrazentrifugiert wurden, eine Weile in Ruhe verharren und eine Schichtungsauflöckerung, verbunden mit einem Materialaustausch, innerhalb der Zelle erfahren. Die Teilung setzte in diesen Zellen so früh ein, daß jeweils eine Tochterzelle fast sämtliche Granula erhielt.

Die Kurven der Abb. 32 stellen den Durchschnürungsverlauf solcher Eizellen mit ungleichmäßiger Granulaverteilung dar. Wenn man diese graphischen Darstellungen mit denen der Abb. 27 vergleicht, so fällt auf, daß die Teilungszeit hier kürzer ist, nämlich nur 22 bzw. 24 Minuten im Gegensatz zu der von 30 und 31 Minuten bei normalen Eizellen. Allerdings ist hier der Einschnürungsablauf jeweils an der Seite (im Projektionsbild), an der die größere Anzahl von Granula liegen (— links, rechts in Abb. 32), unregelmäßiger als der der anderen Seite mit einer geringen Granulazahl.

g) Die Bildung der Teilungsfurche bei Eizellen mit abzentrifugiertem Ball

Daß die Granula auf die Bildung der Teilungsfurche im ultrazentrifugierten Ei einen hemmenden Einfluß ausüben, zeigen die Teilungsabläufe von Eizellen mit vollkommen abzentrifugiertem Ball.

In Abb. 33 sind zwei derartige Fälle dargestellt. Für die Teilung wird nur eine Zeit von 18 bzw. 20 Minuten benötigt. Der Furchungsverlauf ist



Abb. 33. Die Bildung der Teilungsfurche in Eizellen mit abzentrifugiertem Ball. Abszisse: Eizellendurchmesser (1 Teilstrich = 1μ). Ordinate: Zeit.

sehr gleichmäßig. Die 1μ großen Granula beeinflussen also den zeitlichen und gleichmäßigen Ablauf der Durchschnürung.

Ergänzend dazu werden noch Teilungen zum T-Stadium an einigen normalen und ultrazentrifugierten Keimen behandelt.

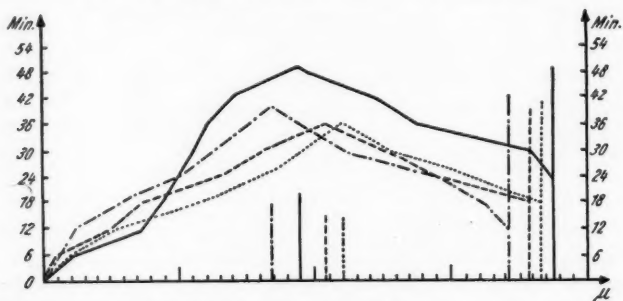


Abb. 34. Teilungsablauf der Zelle S_1 zum T-Stadium. —, normale Zellen; ultrazentrifugierte Zellen. Abszisse: Eizellendurchmesser (1 Teilstrich = 1μ). Ordinate: Zeit.

h) Die Teilung der Zelle S_1 in A und B in nichtzentrifugierten und ultrazentrifugierten Eizellen

In Abb. 34 sind je zwei Fälle einer normalen und ultrazentrifugierten Zelle S_1 dargestellt. Beim Einschnürungsverlauf der Zelle S_1 (—), erfolgte nicht gleichzeitig die Teilung der Zelle P_1 . Im anderen Falle dagegen verliefen die Teilungen synchron. Die anderen beiden Kurven (-----,), stellen Teilungen von ultrazentrifugierten Keimen dar. In beiden Versuchen erhielt jeweils nur eine der beiden Tochterzellen fast sämtliche Granula.

An allen vier Beispielen fällt auf, daß die Teilung an der freien Zellseite im Projektionsbild (d. h. an der keine Nachbarzelle liegt), früher ein-

setzt. Der Einschnürungsablauf ist jedoch unregelmäßig. Dagegen wird die Einschnürung an der Berührungsstelle von P_1 mit S_1 verzögert. Im ersten Falle setzt sie sogar erst in der 24. Minute ein. Es überrascht, daß trotz dieses verspäteten Einsetzens der Einschnürung noch relativ große Furchungswege zurückgelegt werden.

Das Aneinanderpressen der Zellen unter Bildung von Preßwülsten, übt einen Einfluß auf die Zelleinschnürung der Seite aus, an der sich die Blastomere P_1 S_1 berühren.

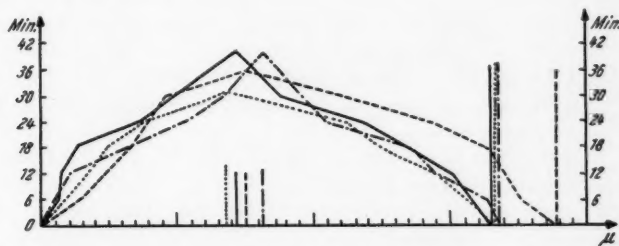


Abb. 35. Teilungsablauf der Zelle P_1 zum T-Stadium: — und - - - - - normale, - - - - - und ultrazentrifugierte Zellen. Abszisse: Eidurchmesser (1 Teilstrich = 1μ). Ordinate: Zeit.

i) Die Teilung der Zelle P_1 in EMST oder S_2 und P_2 im nichtzentrifugierten und ultrazentrifugierten Ei

Der Vollständigkeit wegen wird noch die Teilung der Zelle P_1 in je zwei Fällen eines normalen und ultrazentrifugierten Eies untersucht.

In Abb. 35 stellen die Kurven — und - - - - - die normale Teilung dar, die beiden anderen Kurven zeigen eine Teilung senkrecht zur Schichtung.

Der Furchungsablauf ist in allen vier Fällen unregelmäßig. Der Grund dafür liegt vielleicht darin, daß die Teilung der Zelle S_1 mit der von P_1 synchron verläuft. Damit verbunden ist entweder ein verstärktes Aneinanderpressen, oder ein mehr „lockeres“ Nebeneinanderliegen der Zellen. Bei den oben angeführten Fällen verliefen die Teilungen synchron oder fast synchron.

VI. Allgemeiner Teil

(Gegenüberstellung von Ergebnissen aus dem Schrifttum und eigenen Beobachtungen)

Auf Grund der Versuchsergebnisse werden die Granula-Bewegung und die Teilung des Eies von *Parascaris equorum* zunächst getrennt behandelt sowie bereits bekannten Ergebnissen gegenübergestellt. Es folgt dann der Versuch Beziehungen zwischen der GB und der Teilung herzustellen.

1. Die Granulabewegung nach Angaben im Schrifttum

Fauré-Fremiet (1913) stellt zuerst bei einer der frühesten Anwendungen des Zeitrafferfilmes Bewegungen der Granula im *Parascaris*-Ei fest. Er kommt zu dem Ergebnis, daß diese Bewegung ungeordnet ist, und daß sie an die Bewegung Brownscher Teilchen erinnert. Als Ursache dieser Bewegung nimmt er Protoplasmaströmungen an, unterscheidet diese aber scharf von den gerichteten Strömungen, die bei verschiedenen Zellen festgestellt wurden. Er erkennt ferner, daß es sich hier um eine Bewegung handelt, die viel zu langsam ist, um subjektiv wahrgenommen zu werden.

1934 beobachtete Frommolt im Kaninchen-Ei bei Zeitraffung ein starkes Strömen. Er spricht von einem „Wogen“ und „Wallen“ des Protoplasma in der Eizelle. Er führt weiter aus, daß diese Bewegungen beim Absterben der Zelle stark nachlassen.

Von Möllendorf (1937) untersuchte in der Hauptsache Gewebekulturen (Kaninchenfibrozyten). Er gebraucht für die Bewegungsvorgänge, die sich durch Zusatz bestimmter chemischer Stoffe sowie durch intensive Belichtung in Intensität beeinflussen lassen, den Namen „Körnchenbewegung“.

Nach 1937 findet diese Tatsache der Bewegung zytoplasmatischer Einschlüsse bei Kuhl besondere Beachtung. Es wird jetzt möglich, sich ein genaueres Bild über dieses Phänomen, das er mit „Granulabewegung“ bezeichnet, zu verschaffen.

Kuhl benutzt für seine Untersuchungen an Vertretern verschiedener Tiergruppen ebenfalls die Zeitraffer-Film methode. Als Objekte für seine Beobachtungen dienten Nematoden, Anneliden, Mollusken, Echinodermen, Fische und Säuger. Die GB ließ sich mit Recht als charakteristisch für einen normalen Vorgang in nicht geschädigten Zellen ansehen. Sie erinnert bei unvoreingenommener Betrachtung nur im „gerafften“ Filmlaufbild an die Bewegung Brownscher Teilchen. Kuhl nimmt an, daß hier keine völlig ungeordnete Bewegung der Granula vorliegt, sondern vermutet, daß die Granula unter Umständen innerhalb kleiner Zellareale geordnete Bahnen zurücklegen können. Die Ausdehnungen der Bewegungen in diesen kleinen Zellbezirken, deren Ursache möglicherweise lokalisierte Strömungen im Hyaloplasma sind, werden z. B. für das Ei von *Psammehinus miliaris* mit etwa $2-3\mu$ angegeben. Die Granula werden als Indikatoren für Bewegungserscheinungen der protoplasmatischen Grundsubstanz angesehen. Es ist daher begreiflich, wenn die GB, ohne das kausale Moment zu berücksichtigen, als die nur unter Zeitraffung sichtbare Ortsveränderung der Protoplasmaeinschlüsse intakter Zellen definiert wird.

Ein Vergleich der untersuchten Arten ergab, daß die Geschwindigkeit der GB zum wenigsten „gruppenspezifisch“ ist. Beim Ei der weißen Maus (Kuhl 1937) muß z. B. eine Zeitraffung auf $1/460$ angewandt werden, um im Laufbild etwa die gleiche Intensität der GB zu erreichen wie beim Ei von *Psammehinus miliaris* bei einer Zeitraffung auf $1/80$. In den Eiern von Regenwurmnematoden kann diese Bewegung so groß sein, daß sie ohne Zeitraffung erkennbar ist.

Es wurde weiter festgestellt, daß eine verschiedene Intensität der GB auf verschiedenen Entwicklungsstadien auftritt.

Wird eine lebende Zelle geschädigt, so äußert sich dies im Zeitrafferlaubbild durch eine Verlangsamung der GB. Der Stillstand entspricht ohne Zweifel dem Zelltod, falls keine reversible Schädigung — z. B. im Experiment — vorliegt.

Die bisher angeführten intrazellulären Bewegungsvorgänge berücksichtigen gleichmäßig die Bewegung sämtlicher Granulatypen im Zytoplasma mit Ausnahme der Kern- und Spindelräume. Hier können bei den einzelnen Objekten bemerkenswerte Unterschiede auftreten.

Eingehend wurde die Frage der GB auf dem IV. internationalen Zellforschungskongreß (1936) erörtert. Von Möllendorf vertrat die Ansicht, daß man die Intensität der Bewegung der Körnchen als ein Maß für die Viskosität in Anspruch nehmen kann. Ein Teil der Teilnehmer neigte dazu, in dieser Bewegung eine gezwungene Brownsche Molekularbewegung zu sehen. Im Gegensatz dazu stellte sich vor allem Levi, der die Ursache dieser Bewegung auf Protoplasmaströmungen zurückführte, die mit der Brownischen Molekularbewegung nicht verwechselt werden sollen.

Genauere Untersuchungen über die GB führte Schwöbel (1952) am Ei von *Parascaris equorum* durch. Er untersuchte vor allem die Abhängigkeit der GB von verschiedenen Temperaturen, die GB unter Luftabschluß, sowie den Einfluß des Pressens und Ultrazentrifugierens. Der Unterschied zwischen der Auffassung Schwöbels und den hier vorliegenden Beobachtungen ist etwa folgender:

Schwöbel führte die Intensitätsmessungen der GB vor und während der Vorkernvereinigung durch. Hier fanden die Messungen während des Teilungsablaufes statt. Infolgedessen mußten zwangsläufig die Messungen alle 2–3 Minuten erfolgen, während Schwöbel nur alle 30 Minuten maß. Auch in den Fällen einer durch Ultrazentrifugierung hervorgerufenen Gestaltsveränderung der Eizellen wurden die Messungen alle 2–3 Minuten ausgeführt.

Schwöbel raffte die Zeit auf $\frac{1}{80}$, während in der vorliegenden Untersuchung eine Zeitraffung auf ein $\frac{1}{160}$ angewandt wurde. Diese Raffung erwies sich als durchaus geeignet, mit Hilfe von sechs Bildern pro Minute, die Granula über eine Zeit von 1 Minute in der Teilbildanalyse zu verfolgen.

2. Die Granulabewegung (GB) nach eigenen Beobachtungen

Die Brownsche Molekularbewegung ist eine durch Molekülstöße verursachte Verlagerung von mikroskopisch kleinen Teilchen (Kolloidteilchen) in einer Flüssigkeit; sie ist subjektiv sichtbar.

Läßt sich diese Definition auch auf die GB im *Parascaris*-Ei anwenden? Vor einem direkten Vergleich der GB mit der Brownischen Bewegung ist zu warnen.

Erstens wird die GB erst durch die Änderung des menschlichen Zeitmoments im Zeitrafferlaubbild sichtbar.

Zweitens kann man das Zytoplasma wegen seiner Struktureigentümlichkeiten, die dauernden Änderungen unterworfen sind, nicht ohne weiteres mit einer Flüssigkeit vergleichen.

Drittens handelt es sich bei den Granula um Zytoplasmaeinschlüsse von verschiedener Größe. Die großen Granula erreichen einen Durchmesser von durchschnittlich 1μ , während die kleinsten Granula $0,1-0,3\mu$ messen. Daß sich die Bewegungsart der Granula von verschiedener Schwere und Größe deutlich voneinander unterscheidet, konnte an ultrazentrifugierten, geschichteten Eizellen sicher nachgewiesen werden.

Die Bewegungen der kleinsten Granula im Zeitrafferlaufbild sind noch am ehesten mit der Brownschen Molekularbewegung zu vergleichen. Abwegig scheint es jedoch zu sein, ähnliches von den 1μ großen Granula zu behaupten. Ihre Bewegungsart ist nicht nur eine andere, sondern die BMB würde, selbst wenn es sich um eine solche hier handelte, von verschiedenen Faktoren, insbesondere von gerichteten Strömungen, die in bestimmten Eibezirken vor und während der Teilung auftreten, vollkommen überlagert werden. Solche „gerichtete Strömungen“ sind im Zeitrafferlaufbild deutlich zu sehen.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die größeren Granula, die einwandfrei aus Reservestoffen, besonders Fetten, bestehen, eine große Oberflächenspannung aufweisen. Dies zeigt sich nicht nur in der Tatsache, daß diese Granula sich leicht „anziehen“, wenn sie in einem bestimmten Abstand voneinander liegen, sondern sie verschmelzen auch öfter miteinander. Eindrucksvoll sichtbar wird dieser Vorgang dann, wenn ein Keim sich zum Embryo entwickelt hat und in der Eihülle lebhaft Bewegungen ausführt, dem im Ein- oder Zweizellenstadium die leichten, großen Granula abzentrifugiert worden waren. Der sich bewegende Embryo kann den Ball sogar in kleinere Teilstücke zerlegen (zerquetschen). Die einzelnen Teilstücke kugeln sich sofort ab und können, sobald sie wieder miteinander in Berührung kommen, erneut zu einem einzigen Ball verschmelzen.

Ebenso zeigen einzelne Granula häufig eine Bewegung zum Ball hin, als von ihm fort, wenn es sich um ein ultrazentrifugiertes Ei handelt. Selbst intensiv einsetzende Strömungen, die auf bestimmten Entwicklungsphasen deutlich werden, vermögen es nicht, den Granulaball zu zerstreuen. Nur aus der Randzone des Balles können einzelne Granula austreten; sie werden dann von der Strömung erfaßt und führen in der Teilbildanalyse nachweisbare wirbelartige passive Bewegungen aus (die Beispiele dafür folgen im Abschnitt über den Teilungsrhythmus).

Die Intensität der Bewegung der Granula ist abhängig von der Viskosität des Zytoplasma. Daß diese sich ändert, besonders auffallend während der Teilung, steht außer Zweifel. Die Viskositätsänderung geht klar hervor aus den hier dargestellten Messungen. Die Ergebnisse stimmen mit denen von Kühn (1955) bei Protozoen und bei *Echinodermen*-Eiern einwandfrei überein.

Daß die Temperatur einen erheblichen Einfluß auf die Viskosität und damit auf die GB hat, ist bereits von Boveri (1910) angegeben worden.

Auch hier konnte dieser Temperatureinfluß auf die Viskosität bewiesen werden.

Ferner wurden zeitlich und örtlich begrenzte Strömungen im Zytoplasma während der Teilung festgestellt, die die GB erheblich beeinflussen.

Aus dem vorstehenden Überblick könnte leicht der Eindruck entstehen, als solle das Vorkommen einer BMB in der lebenden, nicht geschädigten Zelle abgelehnt werden. Dies ist nicht der Fall. BMB, besonders der kleinsten Zytoplasmaeinschlüsse, der schwersten Granula also, kann durchaus vorhanden sein. Sie kann besonders dann auftreten, wenn diese kleinen Partikel in Vakuolen liegen wie dies von Schwöbel (1952) vermutet und festgestellt wurde. Sie würde im Zellplasma besonders dann stattfinden, wenn eine sehr geringe Viskosität vorliegt. Trotzdem scheint das Vorkommen der BMB nach den bisher festgestellten Tatsachen sehr selten zu sein. Eine subjektiv sichtbare Bewegung wurde bis jetzt nur in einem Fall von Kuhl bei *Botryllus* beobachtet. Im übrigen bis jetzt untersuchten Material, wird sie von Kräften, wie Oberflächenspannungsveränderungen der Eizelle sowie lokalen und gerichteten Strömungen, überlagert werden. Daß die größeren Granula die Bewegung der kleinen beeinträchtigen können, steht fest.

Im Gegensatz dazu steht die Behauptung Schwöbels, der die Bewegung der Granula in ganzen Eibezirken als langsame BMB auffaßt. Wenn Schwöbel an dieser Stelle Pekarek (1932) zitiert und u. a. sagt: „Eine ähnliche Beobachtung wird von Untersuchern der BMB beschrieben, und zwar tritt hier der Eindruck des partiellen Hin- und Her-rückens dann in Erscheinung, wenn die Lagerung der Brownschen Teilchen eine gewisse Dichte überschreitet.“ Die Behauptung wird für eine Bewegung innerhalb kleinerer Eibezirke zutreffen. Da sich aber diese Art der Bewegungen besonders vor und während der Teilung oft über die ganze Zelle erstrecken und ein mehrmaliges Hin- und Herströmen im Zeitrafferlaufbild zeigen, muß von dieser Erklärung Abstand genommen werden (siehe dazu den ZR-Film; im Institut für Kinem. Zellf. einzusehen).

Daß die Granulabewegung während der Teilung in bestimmten Eizonen verschieden ist, braucht nicht noch einmal erwähnt zu werden. Auch im Ei von *Parascaris equorum* tritt, genau so wie bei anderen Zellen (z. B. *Psammodesmus miliaris*), eine viel geringere Bewegung der Granula in der Spindelzone als in den Außenbezirken des Eies auf.

Schwöbels Auffassung (1952), die Intensität der GB während der Vorkernvereinigung bzw. der darauffolgenden Teilung, bliebe unverändert, entspricht durchaus seinen Meßergebnissen. Schwöbels Messungen erfolgten in wesentlich größeren zeitlichen Abständen als in den vorliegenden Untersuchungen. Aus dieser Tatsache lassen sich wohl die Unterschiede der Ergebnisse verstehen.

Es steht fest, daß Intensitätsänderungen in ausgeprägter Form, allerdings oft nur von sehr kurzer Dauer, auftreten. In normalen, nicht ultrazentrifugierten Eizellen findet man ein erstes Maximum der

Bewegungsintensität der Granula während der Prophase, ein zweites während der Anaphase, unmittelbar vor der Zelldurchschnürung (Abb. 5). Beide Maxima können erklärt werden. Während der Prophase ist die Plasmaviskosität nach Angaben mehrerer Autoren am niedrigsten: Es liegt also die größere Bewegungsintensität vor. Kurz vor der Durchschnürung der Zelle, noch während der Anaphase, ist von Beams und King (1948—1951) ebenfalls eine Viskositätsniedrigung vermutet worden. Bei anderen Eizellen wurde von Kuhl (1941 a) in dieser Zeit ein reger Austausch von Zytoplasmaeinschlüssen zwischen den beiden neu entstandenen Blastomeren festgestellt. Zwar tritt dieser beim vorliegenden Objekt nicht sichtbar in Erscheinung, wie dies z. B. bei *Psammochinus miliaris* der Fall ist; ein solcher Austausch dürfte aber sicher auch im *Parascaris*-Ei stattfinden und mit Ursache für dieses zweite Maximum sein.

Damit wäre erklärt, weshalb bei Eizellen mit abzentrifugiertem Ball dieses zweite Maximum nicht mehr auftritt, da dieser regulierende Austausch von Zytoplasmaeinschlüssen durch das Abzentrifugieren von Granula überflüssig geworden ist (Abb. 25).

Daß Temperaturänderungen die beiden Intensitätsmaxima der GB beeinflussen, wurde bereits erwähnt. Schwöbel untersuchte diese Verhältnisse nur bis zur Teilung; seine Ergebnisse in dieser Hinsicht haben jedoch auch für den Teilungsvorgang selbst Geltung.

Sehr hoch sind die Werte für die Bewegungsintensität der Granula in den Randzonen des Eies während der Teilung. Hier treten eindeutig gerichtete Strömungen (im ZR-Laufbild sichtbar) unmittelbar an der Einschnüpfungsfurche aber ungeordnete „Wirbelbewegungen“ auf (nur durch Teilbildanalyse nachweisbar). Es handelt sich hier um eine passive Verlagerung der Granula, die wahrscheinlich mit dem von Beams und King (1937) vielfach zitierten „surface active material“ in Verbindung gebracht werden kann.

Im ultrazentrifugierten Material, das eine Schichtung aufweist, treten die gleichen Erscheinungen wie bei normalen Eizellen auf, falls die Schichtung nicht zu kompakt ist. Ist sie dagegen sehr dicht, so haften die 1μ großen Granula sehr fest aneinander (Oberflächenspannung), so daß eine Zerstreuung der Granula zunächst unmöglich ist. Erst nach einiger Zeit können die Granula verteilt werden; es ist daher verständlich, daß in solchen Eizellen nur das zweite Intensitätsmaximum der Bewegung erreicht wird (Abb. 7). Ähnliches gilt für eine Durchschnürung schräg zur Schichtung, wobei die Teilungsfurche fast schon parallel zu dieser liegt. Handelt es sich aber um eine Schrägschichtung, bei der der Granulaball durch die Zentrifugalkraft aus der Eizelle leicht vorgewölbt wird, so gilt das gleiche wie für eine Zelle, der ein Ball abzentrifugiert wurde (Abb. 7/III).

Die noch vorhandenen Granula, die einzeln in der Zelle zurückgeblieben sind, „erfahren“ durch Viskositätsveränderungen das erste Maximum ihrer Bewegungsintensität, während die anderen, von der Teilungsfurche etwas entfernt liegenden und zusammengeballten Granula von einer der beiden Tochterzellen aufgenommen werden. Sie können weder den Vor-

gang der Teilung durch ihre Lage hemmen, noch während der Teilung wieder zerstreut werden.

Die Intensität der GB ist also abhängig von der Viskosität des Zytoplasma. Diese ist auf den einzelnen Entwicklungsstadien verschieden, wie dies die „zurückwandernden“ Bälle in den verschiedenen Entwicklungsphasen zeigen (Abb. 19). Sie ist relativ gering, durchschnittlich etwa $0,4 \mu$ pro Minute vor der Vorkernvereinigung, steigt jedoch während und nach der Vorkernvereinigung auf $0,5 \mu$ an. Die auftretenden Intensitätsmaxima (Abb. 19/III), besonders nach der Vorkernvereinigung, sind im ersten Fall auf ein starkes Zurückdrängen des Balles durch die Zellwand zurückzuführen, während für das zweite Maximum einsetzende Strömungen im Zytoplasma kurz vor der Teilung verantwortlich sind.

Die Viskosität des Zytoplasma steigt nach der ersten Teilung (das Abzentrifugieren der Granula ist jetzt leichter möglich). So ist es verständlich, daß die Intensität der GB im Zweizellenstadium für die „zurückwandernden“ Granula größer ist, als in den Beispielen vor der Teilung (Abb. 19/IV).

Daß physiologische Vorgänge stattfinden, die sowohl die Schichtung wie auch die spezifische Schwere der einzelnen Eimaterialien beeinflussen und ändern, zeigen die Ultrazentrifugierungsversuche. Wie schon betont, genügt ein ausreichend langes Zentrifugieren keineswegs, um den jeweilig gewünschten Effekt hervorzurufen. Die wesentliche Komponente dafür ist immer der jeweilige Entwicklungszustand des Eies. Deutlich sichtbar wird dies schon in der Größe der abzentrifugierten Bälle.

Es wurden Volumwerte (Durchschnitt von Messungen an 100–150 Bällen) festgestellt.

1. Ball aus einem Einzellenstadium unmittelbar vor der Teilung abzentrifugiert $46,5 \mu$ (Mittelwert).

2. Ball aus einem Einzellenstadium während der einsetzenden Teilung abzentrifugiert $46,5 \mu$ (Mittelwert).

3. Bälle aus dem Zweizellenstadium kurz vor der nächsten Teilung abzentrifugiert; das Volumen beider Bälle zusammen: $54,5 \mu$ (Mittelwert).

4. Bälle aus dem Zweizellenstadium unmittelbar nach der Teilung abzentrifugiert; das Volumen beider Bälle zusammen: $41,6 \mu$ (Mittelwert).

Die Ultrazentrifugierung war für sämtliche Meßgruppen gleich und betrug 10–12 Minuten.

Gelangen Granula, die in Form eines Balles noch mit der Zelle in Verbindung stehen, während der Teilung wieder zurück, so spielen zwei Faktoren eine Rolle:

1. muß die Zeitdauer berücksichtigt werden, in der Granula noch „zurückwandern“ können;

2. muß berücksichtigt werden, ob diese von einem der beiden, oder von beiden Tochterzellen aufgenommen werden. Liegt der Granulaball in der Teilungsfurche, so daß die Möglichkeit des „Zurückwanderns“ in beide Tochterzellen besteht, so ist der Zeitpunkt maßgebend, in dem der Ball von den Tochterzellen getrennt wird. In diesem Augenblick setzt eine

größere Intensität der Bewegung der Granula ein. Vermutlich werden sie erst zu dieser Zeit von der Strömung, die während der Durchschnürung der Eizelle auftritt, erfaßt (Abb. 8, I, II).

Gelangen die Granula dagegen nur in eine Tochterzelle, so werden sie dem gesamten Teilungsgeschehen sofort unterworfen und zeigen eine andere Bewegungsintensität, die aber den vorherigen Ausführungen keineswegs widerspricht.

Die Versuche bestätigen uns, daß die Intensität der GB ein relatives Maß für die Viskosität des Zytoplasma, das heißt bestimmte Änderungen der Plasmakolloide, ist.

Zur Stützung dieser Auffassung sei nochmals erwähnt, daß die GB bei eintretender Zellschädigung im Zeitrafferlaufbild allmählich langsamer wird und beim Zelltod völlig aufhört: Die Koagulation des „hyaloplasmatischen Zytoplasma“ ist irreversibel eingetreten.

Die Änderung des Zeitfaktors mit Hilfe des Zeitrafferfilmes, die sich daraus ergebende Möglichkeit der Sichtbarmachung der Granulabewegung, sowie die messende Intensitätsanalyse geben dem Zellforscher eine exakte Methode in die Hand, Viskositätsänderungen in einzelnen Zellbezirken festzustellen und zu messen. Die Bedeutung dieser Methode läßt ihre Kompliziertheit ertragen. Fehlerquellen bei der Präparatherstellung und der Zeitrafferfilmaufnahme lassen sich ausschalten.

3. Ultrazentrifugierungsversuche an Eizellen während der Teilung nach Angaben aus dem Schrifttum

Es soll hier nicht versucht werden, eine neue Theorie der Zellteilung auf Grund der dargestellten Ultrazentrifugierungsversuche aufzustellen. Es besteht Einigkeit darüber, daß der Gesamtvorgang der Zellteilung sehr komplexer Natur ist. Als Einzelfaktoren, die heute im Zusammenhang mit der Teilung erwähnt werden, kommen Oberflächenspannungs- und Viskositätsänderungen sowie Aktivierung eines bestimmten Zellmaterials zu einer bestimmten Zeit, bedingt durch physiologische Vorgänge, in Betracht. Sie alle müssen in geordneter Weise zusammenwirken, um eine normale Teilung zu gewährleisten.

Die vorliegenden Versuche befassen sich im wesentlichen mit einem Eibestandteil, nämlich mit den 1μ großen Zytoplasmaeinschlüssen. Es wird zu klären versucht, inwieweit diese Granula den Vorgang der Teilung im ultrazentrifugierten Material beeinflussen können.

Was die „Ballbildung“ betrifft, so wurde von Fauré-Fremiet (1913) beobachtet, daß die Teilungsbereitschaft sowie die Ballbildung am ehesten bei etwa $+32^{\circ}\text{C}$ möglich ist. Er behauptet, daß bei dieser Temperatur die geringste Plasmaviskosität vorliegt.

Hogue (1910) nimmt an, daß zur Ballbildung und Ballabtrennung eine geringe Viskosität Voraussetzung ist; bei steigender Temperatur werden diese Vorgänge erleichtert.

Boveri (1910) behauptet, daß ein „Granulaball“ (kleine spezifisch schwere Granula von $0,1-0,3\mu$ Durchmesser, sowie ein „Dotterball“ (1μ große spezifisch leichteste Granula) gleich leicht hervorzurufen

sind. Ergebnisse dieser Art konnten nicht erzielt werden. Bei allen Versuchen gelang es mir, nur die spezifisch leichtesten Granula von der Eizelle zu trennen. Es trat also nie eine derartige physiologische Zustandsänderung der spezifischen Gewichte der einzelnen Eimaterialien untereinander auf, die die Bildung eines „Dotterballes“ ermöglicht hätte.

Die Annahme Boveris, daß die Stellung der Spindel allein für die Ballgröße maßgebend ist, scheint ebenfalls nicht zuzutreffen. Die auftretenden Viskositätsänderungen sind ohne Zweifel erheblich mitverantwortlich. Inwieweit die großen Granula nach Boveris Behauptung die Teilung „stören“ oder verlangsamen, wird weiter unten behandelt.

Hogue (1910) behauptet, daß die Stellung der Spindel unabhängig von der Zentrifugierung ist und führt dies auf eine unsichtbare Polarität des Plasma zurück. Sie ist der Meinung, daß die Spindel jeden beliebigen Winkel zur Eischichtung auf Grund der Plasmapolarität einnehmen kann. Die Drehung der Spindel nach Entnahme eines Eies aus der Zentrifuge führte sie zu der Annahme einer bestehenden „Protoplasmaachse.“

Conklin (1951) kommt nach einer Reihe von Versuchen an Meeresmollusken hinsichtlich der Spindelbildung zu folgender Ansicht: „Generell ist die Achse der Spindel und ihre Lage in der Zelle genau so wie die Teilungsebene durch zytoplasmatische Bewegungen festgelegt, aber die Asteren und möglicherweise auch das hyaloplasmatische Netzwerk, die die Bewegungen der Orientierung bedingen, sind teilweise von der Mischung des entwickelten Kernmaterials und der zytoplasmatischen Substanz, welches — Kernzytoplasma — genannt werden kann, herzuweisen.“

Conklin sagt weiter, daß das Ausfließen des Kernsaftes zu den Asteren, durch diese zur Zelloberfläche und dann zurück an den Äquator der Zelle, gleichzeitig mit der Spannungsverminderung der Randzone an den Polen der Spindel stattfindet. Ebenfalls zu gleicher Zeit erfolgt die Ausdehnung der Zelle in Richtung der Spindelachse. Durch eine erneute Spannungszunahme an den Spindelpolen setzt die Einschnürung der Zelle im Äquator ein. Diese Behauptung von Conklin widerspricht der von Hogue. Deutlich wird dies noch, wenn Conklin weiter behauptet, daß die Spindel erst in dem Augenblick festgelegt wird, wenn die Strahlen, die von den Asteren ausgehen, die Rindenschicht erreichen.

Wäre nach Hogue eine Protoplasmaachse vorhanden, so müßte eine Teilung auch parallel zur Schichtung und damit verbunden eine Asterbildung möglich sein. Dies trifft für das *Parascaris*-Ei nicht zu, da die 1μ großen Granula die Ausbildung eines Aster in ihrem Bereich nicht zulassen.

Zwei Ansichten stehen sich gegenüber, wenn Hogue behauptet, daß die ungleichmäßige Verteilung der Granula die Teilung sowie die Entwicklung nicht beeinflussen soll, da die Granula keine „organbildenden“ Stoffe sind.

Kaudewitz (1950) stimmt damit nicht überein. Er stellt bei zentrifugierten Eiern von *Daphnia pulex* eine durch die Materialschichtung bedingte eindeutige Entwicklungshemmung fest.

Die eigenen Versuche erbrachten die gleichen Ergebnisse für das *Parascaris*-Ei.

Beams und King (1936—1951) konnten in mehreren Arbeiten Ergebnisse erzielen, die mit den hier vorliegenden Resultaten gut übereinstimmen.

Aus ultrazentrifugierten *Parascaris*-Eiern konnten diese Autoren ein Zellmaterial isolieren, das sie nicht nur für die Teilung, sondern sogar für die Bildung der Teilungsmembran verantwortlich machen. Beams und King nennen diesen Eibestandteil „surface active membrane forming material“ oder kürzer „surface active material“. Durch das Zentrifugieren bei sehr hohen Umdrehungszahlen von Eizellen während der Teilung trat dieses hyaline Material aus der Zelle aus und führte amöboide Bewegungen aus. Es konnten zwar weitere Kernteilungen beobachtet werden, aber eine Zellteilung blieb aus. Dieses „surface active material“ konnte auch in Form von amöboiden Fortsätzen aus der zentrifugierten Zelle hervortreten. Nach Rücktritt in die Zelle konnte die Zellteilung stattfinden. Ein Vergleich dieses Materials mit dem von Merton beschriebenen Kinoplasma oder mit den in der Literatur angegebenen „Protuberanzen“ und „bubbles“, wird von Beams und King nicht angestellt.

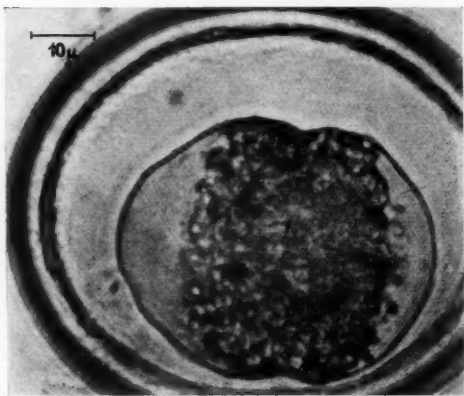


Abb. 36. Normale Eizelle während der Teilung. Die Granula liegen sämtlich in der Nähe der Teilungsfurche. Die Eipole sind granulafrei.

Ebenso wichtig sind folgende Feststellungen dieser Autoren. Das „surface active material“ soll unwirksam sein, wenn es in einer ungünstigen Lage in der Zelle, so z. B. ohne Kontakt mit der Spindel liegt. Auch starke Zusammenballungen von Zytoplasmacinschlüssen sollen seine Wirkung beeinträchtigen.

Diese Ergebnisse stehen durchaus im Einklang mit den Ergebnissen am eigenen Versuchsmaterial.

Dagegen sind die Feststellungen von E. B. Harvey (1932—1936) am Ei von *Arbacia punctulata* nach Zentrifugierung schwieriger zu deuten. Es wurde eine Zerklüftung der Eizelle in vier Teile erreicht; die einzelnen Teile, auch wenn sie kernlos waren, teilten und entwickelten sich sogar teilweise. Eine Klüftung des *Parascaris*-Eies in dieser Form wurde nicht beobachtet. Der Dotterreichtum des *Parascaris*-Eies wird wohl dafür verantwortlich sein.

4. Der Teilungsablauf nichtzentrifugierter und ultrazentrifugierter Eizellen nach eigenen Beobachtungen

Die Vermutungen von Boveri, Kaudewitz, Beams und King, daß nicht alle „Eimaterialien“ auf Grund ihrer durch die Ultrazentri-

fugierung eingenommenen neuen Lage den Teilungsrhythmus beeinflussen, treffen zu. Einwandfrei kann dies für die 1μ großen Granula, die *Beams* und *King* auch mit „Ölkugeln“ bezeichnen, bestätigt werden. Schon eine oberflächliche Betrachtung der Einschnürungskurven von normalen, durch Wärme beeinflussten und solchen Eizellen, denen die Granula abzentriert wurden (Abb. 27, 28 und 33), liefert dafür den Beweis. Die 1μ großen Granula verzögern die Bildung der Einschnürungsfurche.

Nach *Beams* und *King* wirkt das „surface active material“, von den Polen der Eizelle ausgehend, in Richtung der Teilungsfurche und trägt

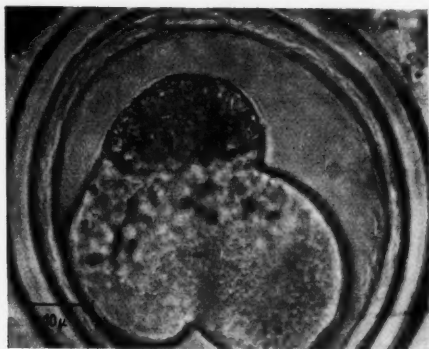


Abb. 37.



Abb. 38.

Abb. 37. Ultrazentrifugierter Keim. Teilung schräg zur Schichtung mit vorgewölbtem Granulaball (aus dem Zeitrafferlaufbild).

Abb. 38. Gleiches Ei wie in Abb. 37. Nach der Teilung. Der dichte Ball wurde als „Ganzes“ mehr in das Zellinnere verlagert. B = Ball.

somit wesentlich zur Teilung bei. Setzen die 1μ großen Granula diesem Material Widerstand entgegen, so dürfen sie bei der Teilung einer normalen Eizelle nicht in seinem Wirkungsbereich liegen. Dies ist tatsächlich der Fall.

Abb. 36 zeigt ein derartiges Ei. Die beiden Zellpole weisen hyalindurchsichtiges Protoplasma auf. Das gesamte Granulamaterial liegt in der Gegend der Teilungsfurche. Während der Teilung ist die Randzone der Einschnürungsfurche (im projizierten Bild) von den Granula stark aufgelockert (im Zeitrafferlaufbild gut zu erkennen).

Zweierlei wird dadurch erreicht: 1. die Granula werden auf diese Weise in eine Lage gebracht, in der sie das „Oberflächenaktivmaterial“ am wenigsten in seiner Wirksamkeit hindern; 2. wird durch ihre Lage eine möglichst gleiche Verteilung der Granula auf die beiden Tochterzellen gesichert.

In welchem Maße die 1μ großen Granula den Teilungsverlauf beeinflussen, zeigt sich erst deutlich an den Beispielen des ultrazentrifugierten

Materialen. Schnürt sich die Zelle senkrecht zu der durch die Zentrifugierung bewirkten Schichtung ein, wie das häufig der Fall ist, wenn die Zelle sich nicht unmittelbar nach Entnahme aus der Ultrazentrifuge bereits teilt, so daß die Spindel ihre Lage noch verändern kann, so kommt es sehr darauf an, wie „kompakt“ die Granula liegen. Sind sie durch starkes Zentrifugieren sehr eng zusammengepreßt, so wird die Einschnürung für längere Zeit an ihrer Stelle unterdrückt (Abb. 29, ——— Kurve).

Der Furchungsweg der gegenüberliegenden Seite (im projizierten Teilbild) ist daher viel größer. Ist der Widerstand der zusammengeballten Granula endlich überwunden (etwa nach der 24. Minute bei dem angeführ-

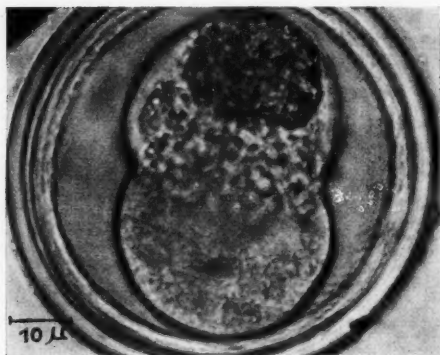


Abb. 39.

Abb. 39. Teilung „parallel“ zur Zentrifugierungsschichtung. Der Ball wird als „Ganzes“ verlagert (aus dem Zeitrafferlaufbild).

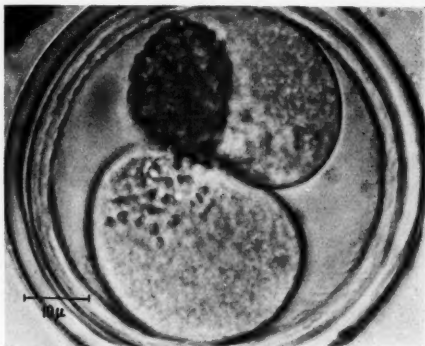


Abb. 40.

Abb. 40. Das gleiche Ei wie in Abb. 39 nach der Teilung. Die Verlagerung des Balles ist erfolgt.

ten Beispiel), so werden innerhalb kurzer Zeit große Einschnürungswege zurückgelegt.

Ist die Schichtung in den Zellen nicht sehr dicht, so tritt lediglich gegenüber einer normalen Durchschnürung eine Verzögerung im Furchungsablauf ein.

Erfolgt die Teilung schräg zur Schichtung, so spielt die Lage der Granula gegenüber der Furchungsachse (Abb. 26) ebenfalls eine wichtige Rolle. Liegt die Achse derart, daß beide Tochterzellen, zwar nicht jede gleich viele, aber immerhin Granula erhalten, und liegen diese sehr dicht, so kann man den Teilungsverlauf mit dem einer nicht stark ultrazentrifugierten Eizelle senkrecht zur Schichtung vergleichen (Abb. 30, Kurve - - - - -).

Liegt die Durchschnürungsachse so wie es Abb. 37 zeigt und die Kurve - - - - - der Abb. 30 darstellt, so befinden sich die Granula im direkten Wirkungsbereich des „surface active material“ und setzen somit der Einschnürung in ihrem Lagebereich Widerstand entgegen, der in den beiden verschie-

denen Einschnürungswegen beider Seiten (im projizierten Teilbild) zum Ausdruck kommt. Es fällt auf, daß nach der Durchschnürung des Eies in Abb. 38, die Randzone der einen Tochterzelle, die die meisten Granula erhielt, ^B sehr aufgelockert ist, während der kompakte Granulaball in das Zellinnere verlagert worden ist.

Es wurde schon betont, daß eine Teilung genau parallel zur Schichtung nicht möglich ist. Können jedoch die Granula sozusagen als „Ganzes“ von einem Eipol in eine „seitliche Lage“ der Zelle verlagert werden, so kann die Teilung ohne Schädigung doch noch erfolgen. Die Abb. 39 und 40 stellen einen solchen Fall dar.

Die Granulamasse wurde als „Ganzes“ von dem durch sehr stark strömendes, im Zeitrafferlaufbild sichtbares Plasma, in eine seitliche Lage abgedrängt (möglicherweise handelt es sich hierbei um das „surface active material“). Die natürliche Folge davon ist, daß, so lange die Granula verlagert werden, die Einschnürung nur sehr langsam vor sich geht (Abb. 30, ——— Kurve).

Das Verhalten einer ultrazentrifugierten Eizelle mit einem leicht vorgewölbten Ball, die sich unmittelbar nach Entnahme aus der Zentrifuge teilt, zeigen die Abb. 41, 42 und 43. In dem Teil der Eizelle, der die kleinen, spezifisch schwersten Granula enthält, bildet sich ein Aster aus.

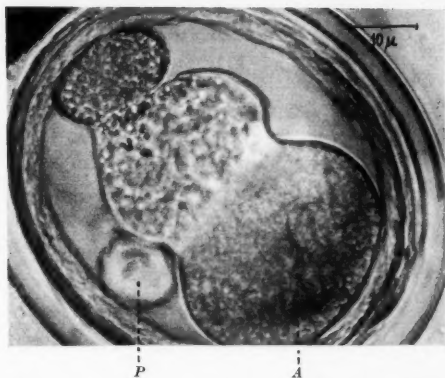


Abb. 42. Das gleiche Ei 10 Minuten später als in Abb. 41. Zelle platzt; Austritt von Plasmakugeln. A = Aster, P = Plasmakugel.

Dagegen ist dem Zytoplasma unmöglich, die 1μ großen Granula zu „umfließen“, die durch die Membranspannung heftig in die Zelle zurückgedrängt werden. Als Folge davon platzt die Zelle in dem Bereich,

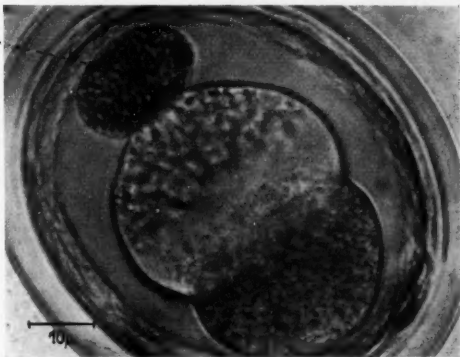


Abb. 41. Teilung eines ultrazentrifugierten *Parascaris*-Eies parallel zur Schichtung mit vorgewölbtem Granulaball = B (aus dem Zeitrafferlaufbild).

in dem beide Materialien in entgegengesetzter Richtung „strömen“. Das Zytoplasma tritt in Form von Kugeln aus der Eizelle aus; eine Teilung oder gar Entwicklung eines solchen Keimes ist nicht mehr möglich.

Deutlich zeigen die angeführten Beispiele von Ball-Eiern, wie sehr die 1μ großen Granula die Einschnürung hemmen. In Abb. 31 ist der Verlauf der Einschnürung derartiger Zellen dargestellt. Es kommt auch hier auf die Lage des Balles gegenüber der Teilungsfurche sowie auf die Zeitdauer an, in der es möglich ist, daß Granula in eine oder beide Tochterzellen zurückgelangen können. Können nur wenige Granula in die Eizelle zurück, und liegt der Ball in der Furchungsachse, so wird die

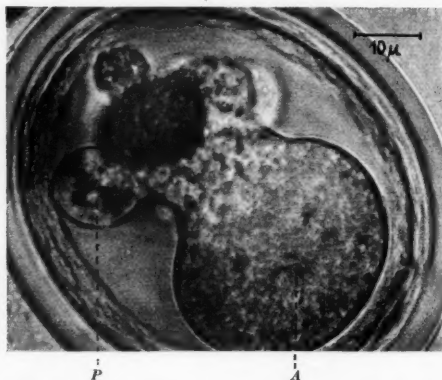


Abb. 43. Die gleiche Eizelle 20 Minuten später als Abb. 41. Mehrere Plasmakugeln sind aus der Zelle ausgetreten. Es erfolgte keine Teilung mehr. A = Aster, P = Plasmakugeln.

Einzelne Phasen des Einschnürungsverlaufes sind durch die Zahlen in den Abb. 44 und 45 gekennzeichnet. In Abb. 44 gelangen nur wenige Granula in die beiden Tochterzellen. Der Einschnürungsverlauf der Ballseite wird gegenüber der anderen Seite (im projizierten Bild) gehemmt. Eindrucksvoll sind die starken Bewegungen einiger eingezeichneter Granula in der Nähe der Teilungsfurche im Gegensatz zu denen, die mehr im Eizentrum liegen. Diese Unterschiede lassen auf die große Bewegungsaktivität einer Plasmakomponente schließen, die die Granula in dieser Eizone passiv verlagert (vielleicht dem „surface active membrane formig material“ gleichzusetzen. Im Zeitrafferlaufbild können entlang der Zellmembran in diesen Zonen Strömungen beobachtet werden).

In Abb. 45 wird der Granulaball von einer Tochterzelle aufgenommen. Die Teilbilder zeigen eine stärkere Aktivität der Einschnürungsfurche in der Ballabschnürungszone (im Bild oben) gegenüber der Zone, die unmittelbar in Ballnähe liegt (im Bild unten). Nach Beendigung der Durchschnürung

Einschnürung der „Ballseite“ (im Projektionsbild) gehemmt. Dies zeigt sich in dem steilen Anstieg der Kurve — in Abb. 31. Gelangen mehrere Granula in beide oder nur eine Tochterzelle zurück, so setzt die Einschnürung der „Ballseite“ (im projizierten Bild) so lange aus, bis keine Granula mehr in eine oder beide Tochterzellen zurückgelangen können. Greift man bestimmte Zeiten für einen derartigen Teilungsverlauf aus der Teilbildanalyse heraus und zeichnet die Teilbilder nach der angeführten Methode übereinander, so wird dies einwandfrei deutlich.

wird der Ball von der Zellmembran (6) einige Mikron in seiner Gesamtheit „wegbefördert“.

Dieser Vorgang wird in Abb. 46 noch deutlicher. Der Ball, der in diesem

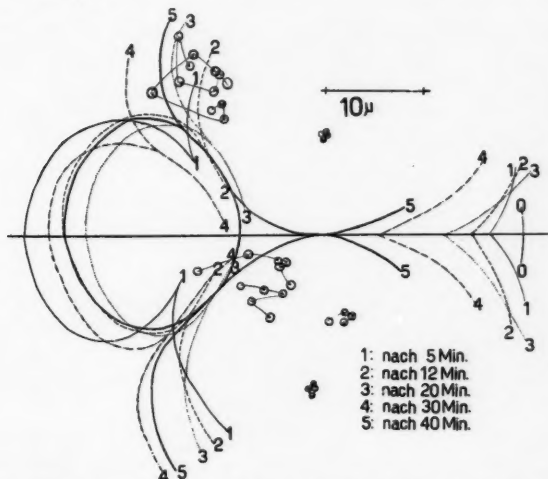


Abb. 44. Teilbildanalyse des Verhaltens eines abzentrifugierten Balles, der in der Furche liegt. Vom Ball gelangen nur noch wenige Granula in die Tochterzelle zurück. Ihre Wege sind angegeben.

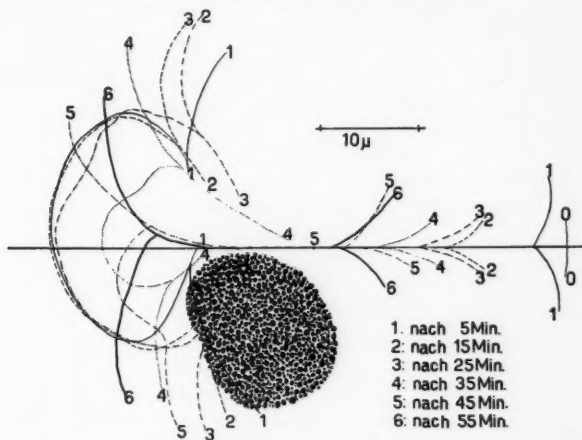


Abb. 45. Teilbildanalyse der Aufnahme eines abzentrifugierten Balles in eine Tochterzelle.

Falle wieder in die Zelle zurückgelangt, wird auch hier als Ganzes ins Eiinnere verlagert. Vermutlich geschieht dies durch das infolge des Zentrifugierens in die Mitte der Eizelle gelangte Zytoplasma, das sofort nach Ent-

nahme aus der Zentrifuge in Richtung der angegebenen Pfeile (im Bild) in der Zelle zu strömen beginnt. Vor der Entfernung, oder dem Wegtransport der Granula aus der Randzone des Eies konnte nie eine Teilung der Zelle beobachtet werden.

Die bisher angeführten Tatsachen gelten auch für Mehrzellenstadien. Abb. 34 und 35 liefern hierfür den Beweis. Allerdings scheint für die Einschnürungshemmung, die besonders bei der Zelle S_1 (im T-Stadium) auftritt, noch die Tatsache eine Rolle zu spielen, daß durch das Nebeneinanderliegen und Aneinanderpressen der Blastomere, ferner durch die Entstehung von

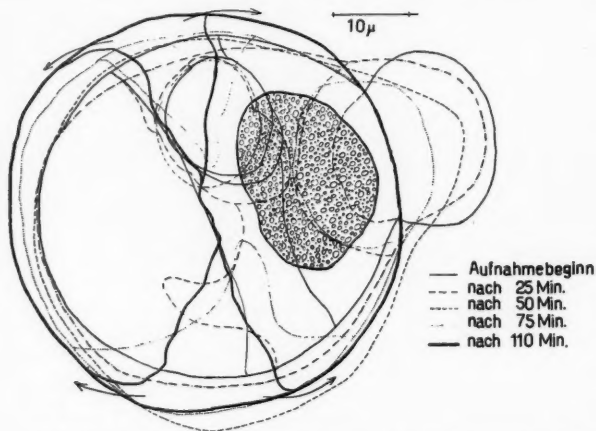


Abb. 46. Teilbildanalyse: Rückverlagerung eines abzentrifugierten dicken „Stielballes“ in die Eizelle vor der ersten Teilung. Graphische Darstellungen des „Weges“ des Balles von der Randzone ins Ei-Innere.

Preßwülsten, die Wirkung des „surface active material“ in den Randbezirken der Eizelle erheblich eingeschränkt wird.

Es besteht somit kein Zweifel darüber, daß die 1μ großen Granula (= „Ölkugeln“) des *Parascaris*-Eies den Einschnürungsvorgang hemmen. Inwieweit stimmen die gewonnenen Ergebnisse mit denen von Boveri, Beams und King sowie Kaudewitz überein. Zur Verlagerung und Ausbildung der Spindel im ultrazentrifugierten Ei ist noch folgendes zu sagen. Es ist nicht nur von Interesse, ob es möglich ist, eine Spindel durch Ultrazentrifugieren zu verlagern, wenn die einsetzende Teilung es noch zuläßt. Der Lage des Eies zur Zentrifugenachse während der Zentrifugierung muß hier ebenfalls eine große Bedeutung beigemessen werden. Dies gilt besonders dann, wenn die Teilung unmittelbar nach dem Ultrazentrifugieren einsetzt. Das „Verhalten“ solcher Eizellen kann leicht zu Irrtümern führen, wenn man derartige Fälle verallgemeinert.

Inwieweit das „surface active membrane forming material“ bei der Furchung beteiligt ist, konnte durch Beobachtungen der großen Granula besonders an ultrazentrifugierten Zellen erkannt werden. Untersuchungen von

Beams und King (1936) können hier bestätigt werden. Die 1μ großen Granula setzen der Wirksamkeit des „surface active membrane forming material“ einen deutlichen Widerstand entgegen.

Eigene Versuche konnten leider nicht ähnliche Ergebnisse wie beim Ei von *Arbacia punctulata* durch Zentrifugierung erzielen. Das *Arbacia punctulata*-Ei wird durch Zentrifugierung in vier Teile „zerklüftet“. Die Wirkung, die durch sehr langes oder mehrmaliges Ultrazentrifugieren beim *Parascaris*-Ei hervorgerufen wird, zeigt Abb. 47.

Ein mehrmals zentrifugiertes *Parascaris*-Ei platzt schließlich innerhalb seiner Hülle. Die großen Granula und das hyaline Zytoplasma kugeln sich ab; die kleinen, spezifisch schwersten Granula und die Sphaerulae werden im perivitellinen Raum verteilt.

Dieses „Verhalten“ kann verschiedene Ursachen haben. Sicherlich ist dafür der Dotterreichtum des *Parascaris*-Eies verantwortlich zu machen. Ebenfalls dürfte die Ausbildung von Asten, wie das von Kühn (1955) beschrieben wird, von Bedeutung sein. Es konnte in keinem der eigenen Versuche beobachtet werden, daß im ultrazentrifugierten, geschichteten Ei ein Aster innerhalb der 1μ großen Granulazone ausgebildet wurde und damit eine Teilung parallel zur Zentrifugierungsschicht möglich war. Ob eine besondere Spindelausbildung, die von Ries-Gersch als „*Ascaris*-Typ“ bezeichnet wurde, mit dazu beiträgt, konnte nicht nachgewiesen werden.

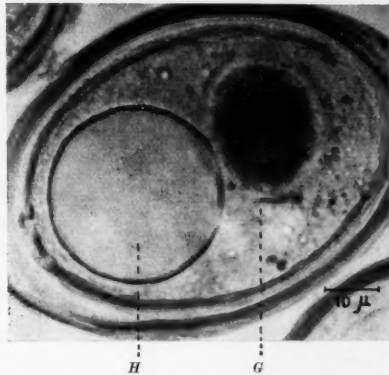


Abb. 47. *Parascaris*-Ei nach mehrmaligem Ultrazentrifugieren. Gesamt-Zentrifugierungszeit: 12 Stunden. Hyalines Plasma und die 1μ großen Granula kugeln sich ab; das übrige Zellmaterial ist unregelmäßig im perivitellinen Raum verteilt. H = hyaline Plasmakugel, G = Zusammenballung der 1μ großen Granula.

5. Die Abhängigkeit von Granulabewegung und Teilungsrhythmus

Wenn ein Zusammenhang zwischen Furchungsverlauf und der Intensität der GB besteht, so muß sich das sowohl im Rhythmus der Einschnürung wie auch in der verschiedenen Intensität der GB zeigen. Sichtbar muß dieses dynamische Verhalten dann werden, wenn man nicht die BMB für die zytoplasmatischen Bewegungsvorgänge verantwortlich machen will, sondern ein Material, das auf Grund von physiologischen Vorgängen kurz vor und während des Ablaufes der Zellteilung mit seiner „Bewegungsintensität“ einsetzt, eine Strömung in unmittelbarer Nähe der Zellmembran hervorruft und dadurch eine passive Verlagerung der Granula

bewirkt (siehe dazu das Zeitrafferlaufbild, besonders bei den ultrazentri-fugierten Eizellen). Ein Vergleich der graphischen Darstellungen von Bewegung- und Teilungsrhythmus, dargestellt in den Kurven der gleichen Eizellen, gibt darüber Aufschluß. (Abb. 5, 7, 8, 19, 25: Bewegungsrhythmus; Abb. 27—35: Teilungsrhythmus).

Ein Minimum der Intensität der GB zeigt sich gleichzeitig oder unmittelbar vor einem Minimum einer zurückgelegten Wegstrecke der Teilungsfurchen. Zwar ist das oft nicht zu erkennen, weil die Hemmung der Einschnürung der „einen Seite“ (im projizierten Bild) meist eine um so größere Aktivierung der „anderen Seite“ hervorruft. Deutlich wird dies, wenn die Einschnürung an beiden „Seiten“ zufällig gleichzeitig gehemmt wird. Die Kurve II in Abb. 7 und die Kurve — der Abb. 30 zeigt einen solchen Fall. Bis etwa zur 20. Minute wurde auf beiden „Seiten“ (im projizierten Bild) ein relativ geringer Einschnürungsweg zurückgelegt. Bis zu dieser Zeit nahm die Intensität der GB geringfügig zu. Nach der 20. Minute wurde dann nicht nur die Intensität der GB stark erhöht, sondern auch die Einschnürungswege der Teilungsfurchen nahmen beträchtlich zu. Dieses Verhalten ist durchaus nicht selbstverständlich, da die Intensität der GB nicht nur in unmittelbarer Nähe der Einschnürungszonen, sondern im ganzen Ei zunimmt.

Dieses Beispiel ließe sich noch durch mehrere andere ergänzen. Der Zusammenhang von GB und Furchungsverlauf würde dadurch noch deutlicher. Es steht fest, daß die große Intensität der GB in bestimmten Entwicklungsphasen der Eizelle besonders in einzelnen Eibezirken durch eine „Plasmasubstanz“ hervorgerufen wird, die durch physiologische Vorgänge — Beginn der Mitose — u. a. in der Zelle aktiviert wird, wodurch die Granula besonders in den Randzonen eine starke passive Verlagerung in der Eizelle erfahren.

VII. Beobachtungen zum Teilungs- und Entwicklungsrhythmus älterer Keime

Es soll hier nicht der Einfluß der stark erhöhten Schwerkraft infolge von Ultrazentrifugierung der *Parascaris*-Eier auf die Determination untersucht werden. Regulierungen kleineren Umfanges in dieser Hinsicht können durchaus stattfinden (Abb. 49, 51). Die Aufgabe dieses Abschnittes ist es, die bereits bei der Untersuchung des Teilungsrhythmus gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen.

Auffällige Entwicklungsverzögerungen in bestimmten Keimbezirken ultrazentrifugierter Zellen, für die die 1μ großen Granula verantwortlich zu machen sind, wurden festgestellt.

Abb. 48 gibt eine Übersicht über 10 Serien durch Ultrazentrifugierung beeinflusster Zellen. Diesen 10 Untersuchungsreihen wurden jeweils 100 Eizellen zugrundegelegt; ihre Entwicklung wurde verfolgt. Schon eine oberflächliche Betrachtung zeigt, daß die kürzeste Entwicklungszeit bis zum Embryo bei den Keimen vorliegt, denen im Einzelstadium der Ball abzentrifugiert wurde. Es wurden (Reihe 2 und 10) nur

8 bzw. 9 Tage Entwicklungszeit bis zum fertigen Embryo, der innerhalb der Eischale lebhaft Bewegungen ausführt, benötigt. Normale Eizellen dagegen (Reihe 1) entwickeln sich in 10 Tagen.

Die längste Entwicklungszeit zeigen Eier, die vor der ersten Teilung, oder vor der Vorkernvereinigung ultrazentrifugiert werden (Reihe 5 und 6). In der Reihe 5 stellt sich die ungleichmäßige Granulaverteilung als hemmender Faktor für den Entwicklungsablauf heraus.

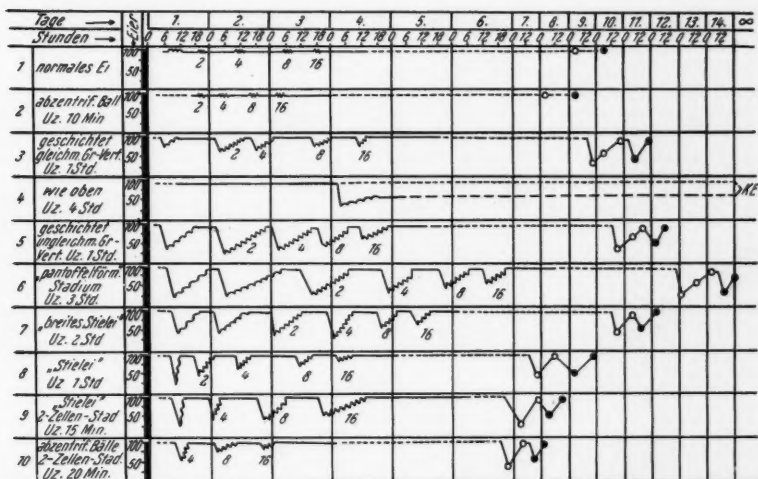


Abb. 48. Darstellung der Entwicklung von zehn Serien von je 100 *Parascaris*-Eiern, die durch „Ultrazentrifugierung“ in verschiedenen Ausmaßen beeinflusst wurden. ~ = durch Ultrazentrifugierung hervorgerufene abnorme Gestalt der Eizelle; sie wird bis zur völligen Abrundung wieder normalisiert. ~ = Vorkernvereinigung, ~ = Teilungen, ~ = Teilungen besonders granulareicher Zellen. ○ = Embryonen, ● = Embryonen mit lebhaften Bewegungen. KE = keine Teilung oder Entwicklung. Zahlen = Teilungen zum Zwei-, Vier-... usw. -Zellenstadium. UZ = Dauer der Ultrazentrifugierung.

In Reihe 6 werden Tage gebraucht, bis das „surface active material“ in der Randzone der Eizelle wirksam werden kann und der Granulaball von der Zelloberfläche abgedrängt wird.

Abb. 48 läßt weiterhin erkennen, wie ungleichmäßig die Teilungen in ultrazentrifugierten Eizellen einsetzen, im Gegensatz zu normalen, oder solchen, denen der Ball abzentrifugiert wurde. Wurden z.B. in der Reihe 2 (abzentrifugierter Ball) für die erste Teilung sämtlicher 100 Eier kaum mehr als 3 Stunden gebraucht, erfolgen also die Teilungen fast synchron, so ziehen sich in der Versuchsreihe 5 die Teilungen der 100 Eizellen fast über einen ganzen Tag hin. Während sie bei etwa 25 Eizellen schon in den ersten Stunden der Beobachtung einsetzen, teilen sich die letzten erst zu viel späteren Zeiten. Als „Nachzügler“ im Teilungsablauf (bes. für

die Teilung zum T-Stadium) wurden immer solche Eizellen ermittelt, die sehr viele, wenn nicht sogar sämtliche Granula besaßen. (N. b.: Für die vorliegende Tabelle [Abb. 48] wurden nicht jeweils alle 100 untersuchten Eier aus dem gleichen Präparat gewählt, sondern es lagen mehrere, unter gleichen Bedingungen hergestellte Präparate vor).

Daß Teilungsverzögerungen in einzelnen Blastomeren auftreten können,

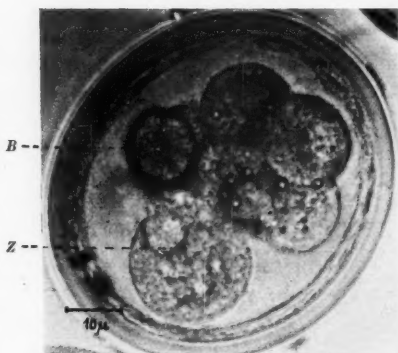


Abb. 49.

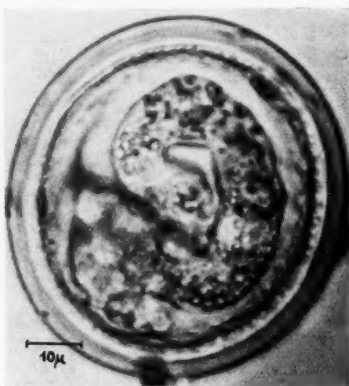


Abb. 50.

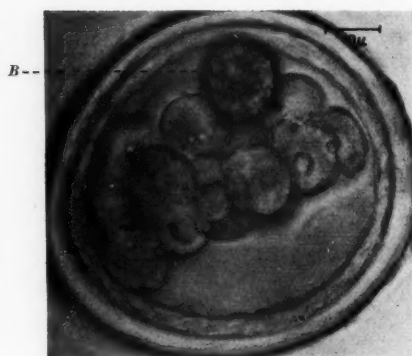


Abb. 51.

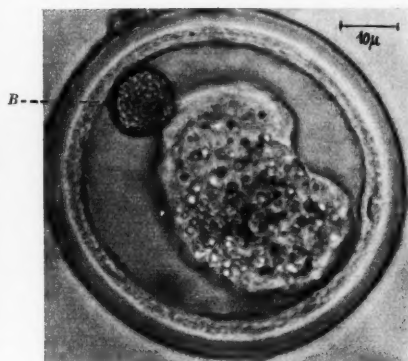


Abb. 52.

Abb. 49. „Ballkeim“. In einer Zelle = Z (größte Zelle) tritt Teilungsverzug ein. B = Ball.

Abb. 50. Pathologischer *Parascaris*-Embryo mit relativ normalem Vorderende, aber pathologischem Hinterende.

Abb. 51. Entwicklungsphase eines Ballkeimes, der zur Bildung eines normalen Embryos führte. Der Ball wurde vor der ersten Teilung abzentrifugiert. B = Ball.

Abb. 52. Ballkeim auf späterer Entwicklungsphase. Der Ball wurde vor der ersten Teilung abzentrifugiert. Ein normaler Embryo entstand. B = Ball.

beweist Abb. 49. Aus irgendwelchen noch unbekannten Ursachen setzt die Teilung einer bereits einmal geteilten Zelle aus, während sich die Nachbarblastomere regelmäßig weiterteilen.

Es wurde versucht, diese nicht seltenen Beobachtungen zu deuten. Öfter auftretende pathologische Embryonen, die ein normales Vorderende, aber am Hinterende einen ungeordneten Zellhaufen aufweisen und nur kurze Zeit lebensfähig waren, stützen diese Vermutung (diese Em-

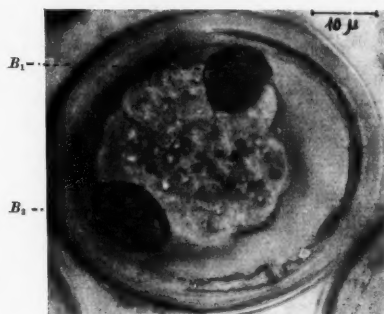


Abb. 53.

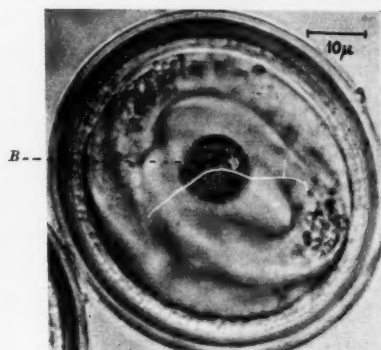


Abb. 54.

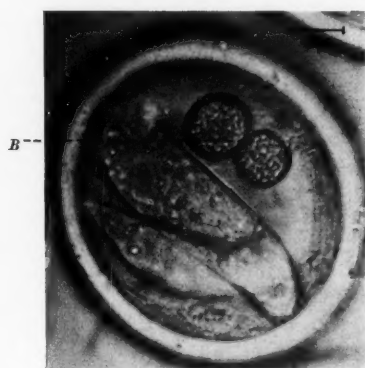


Abb. 55.

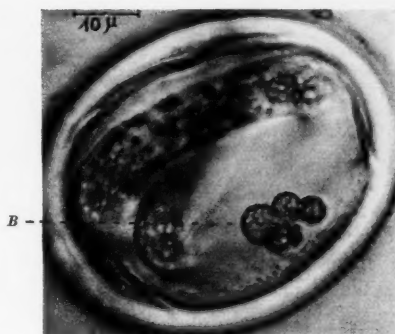


Abb. 56.

Abb. 53. Phase aus der Entwicklung eines Ballkeimes. Die beiden Bälle wurden nach der ersten Teilung aus dem Zweizellenstadium abzentrifugiert. Eine normale Entwicklung fand statt. B_1 , B_2 die beiden Bälle.

Abb. 54. Embryo mit Ball. Ball im Einzellenstadium abzentrifugiert. B = Ball.

Abb. 55. Embryo mit zwei Bällen (Bälle im Zweizellenstadium abzentrifugiert). B = Bälle.

Abb. 56. Lebhaft beweglicher Embryo hat den Granulaball zerdrückt. Das Zusammenfließen der Teilstücke beginnt. B = Ballfragmente.

bryonen starben meist nach einer Stunde und schrumpften sofort stark zusammen).

Abzentrifugierte Bälle bleiben meist an einem Blastomer an der Stelle ihrer Abschnürung haften. Es ist möglich, daß an dieser „Haftstelle“ die Zellmembran geschädigt ist. Bei weiteren Teilungen der Zelle treten offensichtlich Membranspannungen der Zellwand auf. So konnte in einigen wenigen Fällen beobachtet werden, daß diese „Ballhaftstelle“ wieder reißt und die Granula in die Zelle zurückgelangen. Ist die Zelle, an der der Ball anhaftet, durch inzwischen erfolgte Teilungen schon recht klein geworden, so rufen die aus dem Ball entlassenen Granula eine verzögerte Teilung und Entwicklung des aus dieser Zelle stammenden Keimbezirkes hervor. Auf diese Weise können also pathologische Embryonen entstehen.

In den meisten Fällen läuft die Entwicklung normal ab (Abb. 51, 52, 53). Die Bälle bleiben am Keim so lange haften, bis der Embryo lebhaftere Bewegungen auszuführen beginnt. Dem Embryo ist es möglich, den Ball zu zerdrücken, wie in Abb. 56 dargestellt wird. Die Teilstücke des zerdrückten Balles, die sich sofort abkugeln, können wieder untereinander zu einem großen Ball verschmelzen. Dies wurde häufig beobachtet und läßt sich „äußerlich“ mit zusammenlaufenden Quecksilberkugeln vergleichen.

Die Beobachtungen der späteren Entwicklung ultrazentrifugierter Eier bestätigen somit die Ergebnisse, die während der ersten Teilungen gewonnen wurden.

VIII. Zusammenfassung

1. Das von W. Kuhl als „Granulabewegung“ (GB) bezeichnete Phänomen der nur unter Zeitraffung sichtbaren Ortsveränderung von Zytoplasmaeinschlüssen intakter Zellen wird mit Hilfe des Zeitrafferfilmes und der Teilbildanalyse am nichtzentrifugierten und zentrifugierten Ei von *Parascaris equorum* im Zusammenhang mit der Teilung einer eingehenden Untersuchung unterworfen.

2. Da die Eizelle im perivitellinen Raum nicht ruhig liegt, sind einfache direkte Messungen nicht möglich. Die von W. Schwöbel entwickelte Meßmethode gestattet es, an Hand der allein zur Verfügung stehenden Projektionswege der Granula auf der Filmebene, ein praktisch ausreichend genaues Maß für die von ihnen ausgeführten Bewegungen zu erhalten. Dieses Maß wurde von Einstein (1922) als „Relatives Verschiebungsmittel“ (RVM) bezeichnet und gibt an, um welchen Betrag die Granula in einer bestimmten Zeiteinheit im Mittel ihre Lage zueinander ändern.

3. Der Verlauf der Bildung der Teilungsfurche wurde mit Hilfe der Teilbildanalyse unter Anwendung einer besonderen Meßtechnik genau untersucht und graphisch dargestellt.

4. Durch Ultrazentrifugierung (max. Umdrehungszahl etwa 5400/sec.) konnten die Plasmaeinschlüsse ihrer Schwere nach geschichtet werden; die Bewegungsintensität verschiedener Zytoplasmaeinschlüsse wurde gemessen. Die Abhängigkeit der „Ballbildung“ ultrazentrifugierter Eier vom jeweiligen Entwicklungszustand der Eizelle wurde untersucht.

5. An ultrazentrifugierten Eizellen wurde der Einfluß bestimmter Zelleinschlüsse (Granulakugeln) auf den Ablauf der Teilung analysiert. Die 1μ im Durchmesser großen Granula verzögern den Vorgang der Durchschnürung auffallend, besonders dann, wenn sie eine bestimmte Lage zur Durchschnürungsfurche einnehmen. Die graphischen Darstellungen verschieden stark ultrazentrifugierter Eier mit verschiedener Einstellung der Durchschnürungsfurche zur Schichtung geben darüber Aufschluß.

6. Die Ursache der GB scheint eine Resultante aus dem Zusammenwirken von verschiedenen Faktoren zu sein. Faktoren, die die GB beeinflussen, können physiologische Vorgänge, die sich vor allem in Viskositätsänderungen bemerkbar machen, einsetzende lokale Strömungserscheinungen zu bestimmten Zeiten, ferner aber auch Oberflächenspannungsänderungen der Zellmembran, besonders im ultrazentrifugierten Ei sowie Oberflächenspannungen der Granula selbst sein.

7. Als wesentlich für den Ablauf der Teilung erwies sich das Verhalten der Granula in bestimmten Eibezirken. Der Einfluß des „surface active membrane forming material“ (Beams und King) wird in diesem Zusammenhang diskutiert. Das Vorhandensein eines solchen „Materiales“ konnte nachgewiesen werden.

8. Eindeutige Unterschiede, sowohl in der Art der Bewegung, wie auch in der Intensität, zeigen die kleinen Granula von etwa $0,1-0,3\mu$ Durchmesser, gegenüber den großen Granula von etwa 1μ Durchmesser. Dies veranschaulichen die graphischen Darstellungen für das ultrazentrifugierte, geschichtete Ei.

9. Der Durchschnürungsvorgang sowie die Entwicklung ultrazentrifugierter Eizellen wird von den 1μ großen Granula verzögert. Ein Vergleich verschieden lang ultrazentrifugierter Eizellen gegenüber nichtzentrifugierten zeigt dies deutlich. Die Ursache kann in Zusammenhang mit dem „surface active membrane forming material“ gebracht werden, das in seiner Wirksamkeit durch diese Granula je nach ihrer Lage, die sie zur Durchschnürungsfurche einnehmen, beeinträchtigt wird.

10. Es konnte bewiesen werden, daß enge Beziehungen zwischen der Granulabewegung und dem Furchungsablauf bestehen. Im Augenblick des schnellsten Vordringens der Teilungsfurche oder kurz davor ist die Intensität der GB jeweils am größten.

Literatur

- Autrum, H., 1939: Die Entwicklung von *Parascaris equorum*. Hochschulfilm Nr. C 334 mit Beiheft.
- Beams, H. W., and R. L. King, 1936: Survival of *Ascaris* Eggs after centrifuging. Science 84, 158.
- 1937: Effect of ultracentrifuging on the egg of *Ascaris megalocephala*. Nature 139, 369.
- 1937: The Suppression of cleavage in *Ascaris* Eggs by ultracentrifuging. Biol. Bull. (Am.) 73, 99.

- Beams, H. W., and R. L. King, 1940: Effects of low temperature on survival and mitotic figure of egg of *Ascaris megalocephala*. J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.) 15, 409.
- Weed, Pickels, 1935: The ultracentrifuge. Science 78, 538.
- Boveri, Th., 1910: Über die Teilung zentrifugierter Eier von *Ascaris megalocephala*. Arch. Entw.mechan. 50, 101.
- Chambers, R., 1938: Structural aspects of cell division. Arch. exper. Zellforsch. 22.
- 1950: The cell as an integraded functional body. Ann. New York. Acad. Science 50.
- Einstein, A., 1922: Untersuchungen über die Theorie der „Brownschen Bewegung“. Ostwalds Klassiker Nr. 199. Leipzig 1922.
- Fauré-Fremiet, E., 1913: Le cycle germinatif chez l'*Ascaris megalocephala*. Arch. Anat. microsc. (Fr.) 15, 455.
- 1925: La cinétique du développement. Les presses universitaires de France.
- Frommolt, G., 1934: Die Befruchtung und Furchung des Kanincheneies im Film. Zbl. Gynäk. Jg. 58, Nr. 1.
- Fry, H. J., and M. E. Parks, 1934: Studies of the mitotic figure. IV. Mitotic changes and viscosity changes in eggs of *Arbacia*, *Cumingia* and *Nereis*. Protoplasma 21, 475.
- Harvey, E. B., 1932: The development of half and quarter eggs of *Arbacia punctulata* and of strongly centrifuged whole eggs. Biol. Bull. (Am.) 62.
- 1936: Parthenogenetic merogony or cleavage without nuclei in *Arbacia punctulata*. Biol. Bull. (Am.) Z. 1.
- Henegan, B. J., 1948/1951 (Associate Editor): The Mechanisms of cell division. Annals/New York Academy of Sciences 51, 1948/1951.
- and R. W. Miner, 1948—1951: The Mechanism of cell-division. Annals New York, Academy of Science 51.
- Hogue, M. J., 1910: Über die Wirkung der Zentrifugalkraft auf die Eier von *Ascaris megalocephala*. Arch. Entw.mechan. 29, 109.
- Katô, K., 1933: Viscosity changes in the cytoplasm during mitosis as indicated Brownian movement. Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto. Imp. 8.
- Kaudewitz, F., 1950: Zur Entwicklungsphysiologie von *Daphnia pulex*. Z. wiss. Biol., Abtlg. D. Roux/Archiv 144, 410.
- Kuhl, W., 1937: Die Entwicklung der Bernsteinschnecke *Succinea putris* L. Hochschulfilm C 186, mit Beiheft.
- 1937: Die Entwicklung des Eies der weißen Maus. Hochschulfilm C 244, mit Beiheft.
- 1941 a: Untersuchungen über die Cytdynamik der Furchung und Frühentwicklung des Eies der weißen Maus. Abh. Senckenberg. Naturf. Ges. Frankfurt/M. 456, 1.
- 1941 b: Die Entwicklung des Seeigeleies (*Psammethinus miliaris* Gmel). Hochschulfilm C 382, mit Beiheft.
- 1941 c: Die Entwicklung des marinen Anneliden *Pomatoceros triquetus* L. Hochschulfilm C 385, mit Beiheft.
- 1942: Kinematische Zellforschung. Biol. gen. (L.; Ö.) 16, 265.
- 1943: Die Entwicklung des Blaufelchen. Hochschulfilm C 406, mit Beiheft.
- und G. Kuhl, 1949 a: Neue Ergebnisse zur Cytdynamik der Befruchtung und Furchung des Eies von *Psammethinus miliaris* (Gmel). Zool. Jb. 70, Heft 1.
- 1949 b: Die technischen Grundlagen der Kinematischen Zellforsch. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1949.

- Kuhl, W., 1954: Verdunstungsschutzrahmen und Tauchkappen bei der mikroskopischen Untersuchung lebender Organismen, Zellen und Gewebe über lange Zeiträume. *Mikroskopie* 9/9, 10.
- Kühn, A., 1955: Vorlesung über Entwicklungsphysiologie. Springer-Verlag: Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Möllendorf, W. v., 1937: Beiträge zum Problem der Zellviskosität (Vortrag 4. Intern. Exper. Zellforschungskongreß Kopenhagen, 1936). *Arch. exper. Zellforsch.* 19.
- Pekarek, J., 1930: Absolute Viskositätsmessungen mit Hilfe der Brownschen Molekularbewegung. I. Mitteilung. *Protoplasma* 10, 510.
- 1932: Absolute Viskositätsmessungen mit Hilfe der Brownschen Molekularbewegung. IV. Mitteilung. *Protoplasma* 17.
- Ries, E., und M. Gersch, 1953: *Biologie der Zelle*. B. G. Teubner, Verlagsgesellschaft Leipzig, 1953.
- Spek, J., 1916: Oberflächenspannungsdifferenzen als eine Ursache der Zellteilung. *Arch. Entw.mechan.* 44 (1918).
- 1918: Die amöboiden Bewegungen und Strömungen in den Eizellen einiger Nematoden während der Vereinigung der Vorkerne. *Arch. Entw.mechan.* 44.
- Schwöbel, W., 1952: Untersuchungen zur Granulabewegung im Ei von *Parascaris equorum* (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilmes. *Protoplasma* 41.
- 1952: Beschreibung einer einfachen Zeitraffereinrichtung für Mikrozeitrafferfilme. *Zbl. Mikroskopie* 7.

Untersuchungen über Plasmakonfiguration und Vitalfärbbarkeit von Hyphen aus Basidiomyceten-Fruchtkörpern

Von

Dietlinde Krisai-Knyrim

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 27. Juni 1958)

Mit 14 Textabbildungen

Inhalt	Seite
I. Einleitung und Methodik	66
II. Zur Cytomorphologie des Pilzplasmas	67
III. Zur Vitalfärbung von Pilzhypen	80
IV. Zusammenfassung	87
Literaturverzeichnis	88

I. Einleitung und Methodik

Die Fruchtkörper der Blätter- und Röhrenpilze sind bisher vor allem Gegenstand morphologisch-systematischer Untersuchungen gewesen. Während verschiedene Phycomyceten, Hyphen von einfacher gebauten Ascomyceten und auch die Substrathypen von höher organisierten Ascomyceten und Basidiomyceten häufig zu physiologischen und zellphysiologischen Forschungen herangezogen wurden, geschah dies bei Hyphen aus Fruchtkörpern von Asco- und Basidiomyceten nur selten. Ursache dafür dürften wohl größere technische Schwierigkeiten bei der mikroskopischen Untersuchung sein.

Für meine Untersuchungen verwendete ich fast ausschließlich Blätterpilze aus Laub- und Nadelwäldern der Sandsteinzone des Wienerwaldes in der näheren Umgebung von Wien (Rekawinkel, Salmansdorf) und aus Nadelwäldern der aus Kalk aufgebauten Thermenalpen (Mödling, Frauenstein). Die Pilze wurden in Dosen und Gläsern in das Pflanzenphysiologische Institut gebracht und dort in geschlossenen Glasschalen kühl aufbewahrt. Ich verwendete zu den Untersuchungen höchstens 4 Tage lang gelagerte Pilze. Innerhalb dieser Zeit blieben die Lebensreaktionen der Zellen

normal. Während des Winters und zu vielen Vitalfärbeversuchen besorgte ich frische Exemplare von *Psalliota campestris* aus einer Wiener Champignonzüchtereier.

Zur Untersuchung des Plektenchyms der Fruchtkörper stellte ich mit einem Reichert-Schlittenmikrotom Schnitte von durchschnittlich 40 bis 60 μ Dicke her. Dazu wurde ein etwa 1 cm / 0,5 cm / 0,5 cm großes Längsstück aus dem Strunk des Fruchtkörpers in einiger Entfernung vom Hutansatz entnommen. Die Schnitte der angegebenen Dicke enthielten etwa zwei bis fünf unverletzte Hyphenlagen übereinander zwischen ziemlich beschädigten Deckschichten. Jede Hyphe zeigte eine große Anzahl vollständiger Zellen. Von Entlüftung wurde abgesehen, da durch sie die unverletzten Zellen auch geschädigt worden wären. Aus demselben Grund konnten nur in ganz wenigen Fällen dünnere Schnitte hergestellt werden. Das Schneiden erfolgte je nach Notwendigkeit in destilliertem Wasser, Leitungswasser, schwacher Traubenzuckerlösung oder in Paraffinöl. In diesen Medien blieben die Schnitte bis zur Untersuchung.

Zum Bestimmen der Pilze standen mir die Werke von Haas (1951, 1953), Lange (1940), Moser (1955) und Ricken (1910) zur Verfügung.

II. Zur Cytomorphologie des Pilzplasmas

In diesem Abschnitt soll zunächst auf die eigenartige, schaumige Struktur des Cytoplasmas, die in allen Plektenchymschnitten mit ganz wenigen Ausnahmen vorlag, eingegangen werden. Entsprechende Untersuchungen wurden in den verschiedensten Medien vorgenommen. Weiters wird die verschieden starke Voluminosität des Plasmas in verschiedenen alten Pilzexemplaren beschrieben. Genaue Beobachtungen der Plasmakonfiguration und Veränderungen bei Plasmolyse folgen hierauf. Ein kurzer Abschnitt über Nekrosevorgänge bei Pilzen bildet den Abschluß.

Die Fruchtkörper der Basidiomyceten werden von einem Flechtwerk reich verzweigter, septierter Hyphen aufgebaut. Das Plasma in den Hyphenzellen ist, von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen, stets mehr oder minder schaumig und von einer Anzahl großer und kleiner, gegeneinander häufig abgeplatteter Vakuolen erfüllt. Da diese Erscheinung sehr im Gegensatz zur Plasmagestalt der Zellen höherer Pflanzen steht, die in ihren Zellen zumeist eine einzige, einheitliche, von einem Plasmamantel umgebene Zellsaftvakuole enthalten, wurde ihr besonderes Augenmerk geschenkt.

A. v. Degen (1905, 209) beobachtete in *Aspergillus niger*, *Dematium pullulans* und *Saprolegnia* beim Auswaschen mit Leitungs- und destilliertem Wasser und bei Behandlung mit ganz niedrig konzentrierten Laugen und Säuren schaumige Verwandlung des Protoplasmas. Raybaud (1911) erreichte bei Keimlingen von *Phycomyces* Vakuolenzerfall durch Belichtung. Dubitzky (1934) fand bei *Saprolegnia* einen Zerfall der Vakuole in zahlreiche Teilvakuolen bei Einwirkung von Kampfer und bei Verwundung. Selbst in beträchtlicher Entfernung von der Wundstelle trat die Reaktion noch ein. Infektion durch parasitäre Pilze verursachte bei *Psalliota* Zerklüftung der Vakuolen (Chaze und Sarazin 1935). Aber auch an

normalen *Saprolegnia*-Keimlingen beschrieb *Dubitzky* (1934) Vakuolen, die durch Plasmalamellen und -menisken voneinander getrennt waren. *Buller* fand bei *Pyronema*-Fäden, daß zahlreiche Vakuolen sich an den Längsseiten der Pilzfäden drängten, während das Protoplasma als unregelmäßiger, verbogener Strang sich zwischen ihnen strömend bewegte (*Buller* 1933, 122, vgl. *Küster* 1956, S. 7, Fig. 4). In Fruchtkörperhyphen von Blätter- oder Röhrenpilzen wurde dieser Vakuolenreichtum bisher noch nicht eigens beschrieben.

Versuchsergebnisse

a) Untersuchungen in Paraffinöl

Durch das Schneiden und Untersuchen des Plektenchyms in Paraffinöl wurde jede Veränderung innerhalb des Hyphengeflechtes durch Einwirkung von Luft oder Flüssigkeit weitgehend unterbunden. Der Zustand der Schnitte in Paraffinöl kam daher dem des Plektenchyms im unbeschädigten Fruchtkörper am nächsten.

Craterellus cornucopioides (L.) Fr.: Mittelalter¹ Pilz, 28. 9. 1955. In zahlreichen Hyphen mittelgroße Vakuolen dicht beieinander. In Plasmazwickeln dicht gedrängt kleine Bläschen. Keine Veränderung während der Beobachtung. Abb. 1 a.

Psalliota campestris (L.). Kultur: Mittel, 24. 4. 1955: Schaumstruktur des Plasmas von Anfang an, während der Beobachtung nicht verändert. Gestalt und Lage der Vakuolen bleiben gleich. Große Vakuolen gegeneinander abgeplattet, in Plasmazwickeln dicht gedrängt kleine Vakuolen. Wenig Zellen mit nur 1 oder 2 Vakuolen. Abb. 1 b, 1 c.

Extrem hohe Zahlen von Vakuolen haben auch *Clitocybe odora* (Bull. ex Fr.) Quél. (alt), *Clitocybe lituus* (Fr.) Metr. (alt) und *Hypholoma sublateritium* (Fr.) Quél. (alt).

Clitocybe laccata, var. *proxima* (Scop.) Bolt.: Mittel, 20. 10. 1956. Unmittelbar nach Schneiden im Schnittzentrum Zellen mit nur 1 bis 2 Vakuolen, in Wundrandnähe mehr. Nach 20 Min. viele Zellen gut vakuolisiert. Auch nach 30 Min. nicht alle Zellen mit stark schaumigem Plasma. Nun stundenlang unverändert. Abb. 1 e, f.

Pholiota squarrosa (Pers. ex Fr.) Quél.: Alt, 25. 10. 1956. Viele Zellen mit 1 oder 2 Vakuolen, viele mit stark geteiltem Vakuom. Abb. 1 g.

Verschiedene Vakuolenzahl bei den Zellen desselben Schnittes gab es auch bei *Limacium leucophaeum* [*Hygrophorus leucophaeus* (Scop. Fr.)] (alt), *Limacium eburneum* (Bull.) (mittel) und *Russula aeruginea* (Lindb.) (alt). Abb. 1 d.

Cantharellus cibarius Fr.: Alt, 24. 10. 1956. Zellen überaus klein, etwas unregelmäßig, stets nur ein Zellsaftraum.

Collybia asema Fr.: Alt, 24. 10. 1956. Sehr lange, schmale Zellen; nur eine einheitliche Vakuole.

Hypholoma sublateritium (Fr.) Quél.: Jung, 23. 10. 1956. Regelmäßig zylindrische Zellen; nur eine Zentralvakuole, auch in Wundrandnähe. Abb. 1 h.

Keine oder nur geringe Vakuolisierung zeigten auch *Amanita phalloides* (Vaill.

¹ Die Bezeichnung „jung, mittel, alt“ usw. bezieht sich auf das Alter der Pilze beim Pflücken. „Frisch, lang gelagert“ bezeichnet die Lagerungsdauer von Pilzen aller Altersstufen.

ex Fr.) Secr. (alt), *Cantharellus umbonatus* (Gmel. ex Fr.) Sing. (jung), *Hypholoma sublateritium* (Fr.) Quél. (jung), *Mycena pura* (Pers. ex Fr.) Quél. (mittel) und *Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Quél. (jung).

Um die Schaumstruktur des Pilzplasmas möglichst unmittelbar zu beobachten,

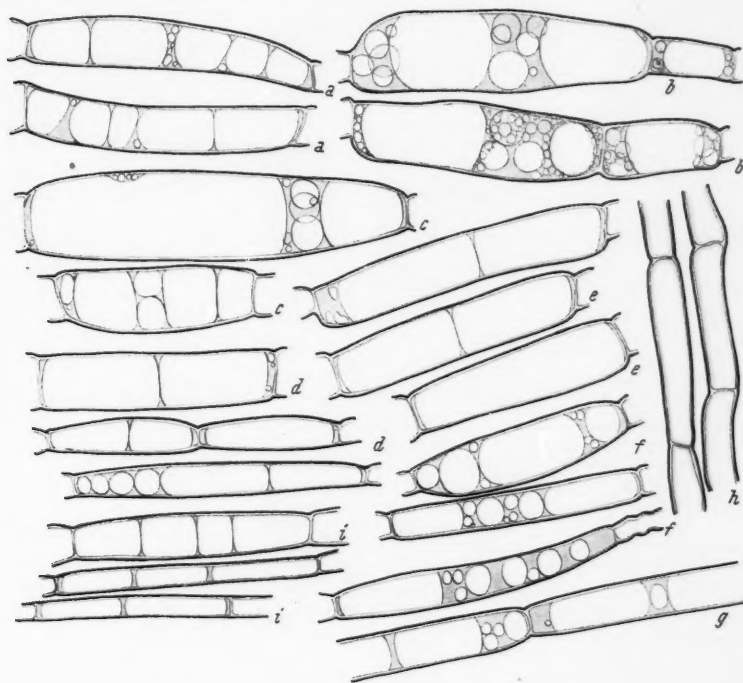


Abb. 1. *a* *Craterellus cornucopioides* — mittelalt — reiche Schaumstruktur — Paraffinöl. *b* *Psalliota campestris*, Kultur — Paraffinöl — mittelalt — sehr viele Vakuolen im kaum gequollenen Plasma. *c* *Psalliota campestris*, Kultur — Paraffinöl — mittelalt — reiche Schaumstruktur. *d* *Limacium eburneum* — Paraffinöl — mittelalt — verschiedener Grad der Schaumigkeit. *e* *Clitocybe laccata* — Paraffinöl — mittelalt — geringe Vakuolenzahl unmittelbar nach dem Schneiden. *f* *Clitocybe laccata* — Paraffinöl — mittelalt — 20 min. später mit größerer Vakuolenzahl. *g* *Pholiota squarrosa* — Paraffinöl — alt. *h* *Hypholoma sublateritium* — jung — Paraffinöl — nur je eine Vakuole. *i* *Pholiota squarrosa* — Paraffinöl — jung — geringe Vakuolisierung.

untersuchte ich Einzelschnitte sofort nach dem Schneiden (Beobachtungsbeginn nach 30 sec.).

Psalliota campestris L., Kultur: Mittel, 15. 2. 1957. Zum Zeitpunkt der Untersuchung liegt die Plasmastruktur fest und erleidet weiterhin keine Veränderung. Neben Zellen mit 1 Vakuole, viele mit 2 und einige mit vielen Vakuolen, Nähe des Schnittandes beeinflusst nicht. Nach 1 Stunde keine Veränderung.

b) Untersuchungen in destilliertem Wasser

Da die Versuche zeigten, daß das Plasma von Anfang an oder wenigstens unmittelbar nach dem Herstellen der Schnitte schaumig war, untersuchte ich zahlreiche Schnitte in destilliertem Wasser, um zu sehen, ob dessen Einwirkung die Vakuolenzerteilung steigern würde. Die Beobachtung erfolgte frühestens 3 bis 5 Minuten nach dem Schneiden.

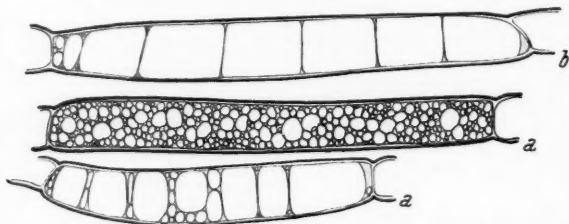


Abb. 2. a *Polyporellus arcularius* — Aqua dest. — mittellalt — sehr starke Zerteilung des Zellsaftraumes. b *Psalliota campestris*, Feld — alt — Aqua dest. — zahlreiche Vakuolen in einer Zelle.

Polyporellus arcularius (Batsch ex Fr.) Pil.: Mittel, 3. 5. 1956. Überaus reich zerteiltes Vakuom. Schichte winziger, dicht gedrängter Vakuolen an Zellwand. Innerhalb der Vakuolenschicht größere Vakuolen in wechselnder Anzahl, manchmal auch nur eine. Keine Veränderung bei lang dauernder Beobachtung. Abb. 2 a.

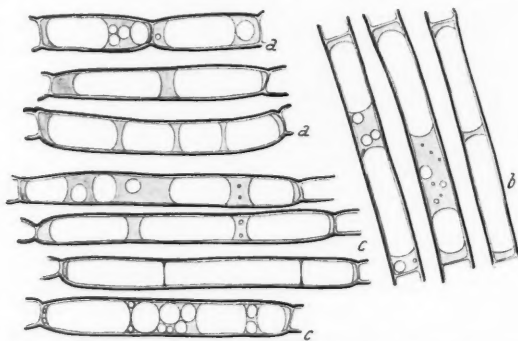


Abb. 3 a. *Pholiota squarrosa* — alt — Paraffinöl — voluminöses Plasma. b *Pholiota squarrosa* — alt — Aqua dest. — Plasma voluminös. c *Hypholoma sublateritium* — mittel — Aqua dest. — alle Grade der Plasmaquellung in einem Schnitt.

Psalliota campestris L. Kultur: Mittel, 15. 2. 1957. 1 Stunde. Viele und wenig Vakuolen in Nachbarzellen (Abb. 9. S. 77).

Psalliota campestris L. Neusiedlersee: Alt, 24. 5. 1956. Mehrere große Vakuolen in einer Zelle, in zwischenliegenden Plasmazwickeln kleine. Abb. 2 b.

Hypholoma sublateritium (Fr.) Quél.: Mittel, 26. 10. 1956. Alle Abstufungen der Vakuolisierung in einem Schnitt. Abb. 3 c. Sehr alt, 26. 10. 1956. Noch lebende Zellen mit sehr starker Vakuolisierung.

Weitere Untersuchungen an *Peziza* sp. (mittel), *Psalliota campestris* L. (sehr

jung), *Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Quél. (jung, mittel, sehr alt), *Tricholoma Georgii* (Clus. ex Fr.) Quél. (jung), *Clitocybe odora* (Bull. ex Fr.) Quél. (sehr alt), *Clitocybe lituus* (Fr.) Metr. (alt), *Clitocybe laccata*, var. *proxima* (Scop.) Bolt. (sehr alt), Basidien junger *Russula persicina* Krbh., em. Melz. et Zv. (= *R. emetica* ss. Bress.) und Paraphysen und Basidien von *Marasmius* sp., Zellen von *Craterellus cornucopioides* (L.) Fr.

c) Hellfeldfärbung mit Neutralrot

Die phosphatgepufferten Neutralrotlösungen (Heilmittelwerke Wien) wurden in einer Verdünnung von 1 : 10.000 auf die Schnitte 10 bis 20 Minuten einwirken lassen (vgl. H. Kinzel 1954). Die Färbung verlief folgendermaßen:

Bis pH 3 fehlte jegliche Membran- oder Vakuolenfärbung. Von pH 3 bis pH 6,2 trat sehr starke, karminrote, nicht salzste Membranfärbung auf. Zwischen pH 6,2 und 6,8 war die Membranfärbung nur mehr ganz schwach, die Vakuolen färbten sich hellrot. Ab pH 6,8 waren die Membranen farbstofffrei und die Zellsaft Räume leuchteten erbeer- bis ziegelrot (vgl. Strugger 1949, 146—157).

Untersucht wurden *Russula persicina* Krbh. et Melz. et Zv., *Phlegmacium caesiocyaneum* Britz und *Psalliota campestris* L. Kultur: Bei pH 8,3 waren Plasma und Membran farblos, alle Vakuolen ziegelrot. Abb. 4 a, 4 b.

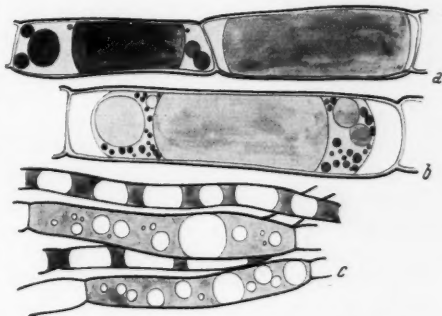


Abb. 4. a *Psalliota campestris* — Neutralrot, pH 8,3 — Zellsaft ziegelrot gefärbt. b *Phlegmacium caesiocyaneum* — Neutralrot, pH 8,3 — zahlreiche, gefärbte Vakuolen im plasmolysierten Protoplasten (Zusatz von 0,7 mol TRZ statt Aqua dest.) c *Phlegmacium caesiocyaneum* — Acridinorange, pH 2,56 — gelbgrüne Plasmafluoreszenz, alle Vakuolen optisch leer.

d) Fluoreszenzfärbung mit Acridinorange

Acridinorange: Dr. G. Grubler & Co., Leipzig, in Phosphatpufferlösungen 1 : 10.000. Die Färbung brachte folgende Ergebnisse:

Unter pH 7 fluoreszierten die Membranen der Zellen zuerst grün, dann gelbgrün, gelb und schließlich gleißend kupferrot. Ab pH 7 gab es keine Membranfluoreszenz. Ab pH 5 bis weit in den alkalischen Bereich fluoreszierte das Cytoplasma homogen grün. Die Zellsäfte fluoreszierten ab pH 6,5 schwach, im alkalischen Bereich intensiv kupferrot (vgl. Strugger 1949, 165—176, K. Höfler 1948).

Untersucht wurden *Psalliota campestris* L., Kultur, und *Phlegmacium caesiocyaneum* Britz., pH 8,3. Alle, auch die kleinsten Vakuolen, leuchteten kupferrot. Abb. 4 c.

e) Fluorochromierung mit Uranin

Uranin konz., Bayer-Leverkusen, in Verdünnung 1 : 10.000 in Phosphatpuffern. Vom sauren Bereich bis etwa pH 8,3 trat lebhaft, gelbgrüne Plas-

mafluoreszenz auf. Die Vakuolen blieben optisch leer. Gequollenes Plasma fluoreszierte besonders intensiv.

Untersucht wurde *Psalliotia campestris* L., Kultur, pH 4,8. Alle Vakuolen optisch leer.

Ergebnisse der Untersuchungen über Schaumstruktur des Protoplasmas in Hyphen der Fruchtkörper von Blätterpilzen

1. In den Hyphen der Fruchtkörper von Blätterpilzen ist das Protoplasma durch besondere Schaumstruktur ausgezeichnet. Der Zellsaftraum ist in eine kleinere oder größere Anzahl von Teilvakuolen zerlegt, von wenigen Ausnahmen abgesehen. Dabei verhält sich der Protoplast in allen Lebensreaktionen vollkommen normal.

2. Es handelt sich anscheinend um stabilisierte Plasmaschäume. Diese sind sofort nach dem Herstellen des Schnittes in den Hyphenzellen zu beobachten und ändern sich nicht durch stundenlanges Einwirken von destilliertem Wasser, Farbstoff-, Traubenzuckerlösungen oder Paraffinöl.

3. Auch in sehr vorsichtig hergestellten Zupfpräparaten von Pilzplektenchym enthalten die Zellen eine gewisse, meist geringe Vakuolenzahl vom Augenblick der mikroskopischen Beobachtung an. Die eventuelle Wirkung des Wundreizes und Druckes kommt also anscheinend bald zum Stillstand und ruft keine weiteren Veränderungen im Laufe einer länger dauernden Untersuchung herbei. Ein einziges Mal wurde innerhalb der ersten 30 Minuten eine Zunahme der Vakuolenzahl festgestellt, worauf diese unverändert blieb. Eine Verschmelzung von Vakuolen, ebenso ein Zerfall des Zellsafttraumes, wurde nie direkt beobachtet.

4. Die Vakuolen sind entweder rund, langgestreckt und an beiden Enden konvex oder langgestreckt mit ebenen Abschlußflächen. Ihre Grenzen gegen das Protoplasma sind scharf. Besondere Grenzlamellen gegen das Innenplasma sind im voll lebensfähigen Zustand des Plasmas meist nicht zu erkennen.

Im ungequollenen Plasma erfüllen die Vakuolen die ganze Zelle dicht und sind, besonders wenn sie größer sind, gegeneinander abgeplattet.

5. Die Durchschnittszahl der Vakuolen in den einzelnen Zellen ist abhängig:

a) von der Pilzart: Pilze mit besonders langen oder sehr kurzen Zellen haben in der Regel einen ungeteilten oder sehr wenig gefächerten Zellsaftraum (*Collybia asema* Fr., *Mycena pura* [Pers. ex Fr.] QuéL., *Cantharellus cibarius* Fr., *C. umbonata* [Gmel. ex Fr.] Sing.). Einzelne Pilzarten sind durch besonders schaumiges Plasma ausgezeichnet (*Psalliotia campestris* L., Kultur, *Clitocybe odora* [Bull. ex Fr.] QuéL., *C. lituus* [Fr.] Metr.);

b) vom Alter der Pilzhypen: Hypen junger Pilze zeigen zumeist wenig Vakuolenteilung, sehr alte recht starke. Auch in ein und demselben Schnitt sind alle Grade der Vakuolisierung vorhanden.

6. Die Vitalfärbung der Pilzhypen zeigte, daß alle Vakuolen „leeren“ Zellsaft enthielten (vgl. S. 82, 88).

Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen lassen vermuten,

daß die Pilze im natürlichen Zustand bereits ein zerteiltes Vakuum besitzen. Möglicherweise wird zusätzlicher Vakuolenzerfall durch Druck und Wundreiz hervorgerufen. In beiden Fällen könnte man annehmen, daß der physiologische Alterszustand auf die Stärke der Vakuolisierung Einfluß hat (vgl. E. Küster 1929, 143).

Bei allen meinen Untersuchungen zeigte sich, daß das Plasma der Pilze in verschiedenstem Grade voluminös war und daß die Vakuolen entsprechend mehr oder weniger kontrahiert erschienen.

Die einzige Notiz über Vakuolenkontraktion bei Blätterpilzen stammt von Friedel von Hofe (1933, 369). Sie berichtete über Vakuolenkontraktion in Zellen älterer *Psalliota*-Exemplare, die durch Wässern beschleunigt und verstärkt wurde. Dagegen wurde diese Erscheinung an höheren Pflanzen vielfach untersucht (vgl. F. Weber 1930, E. Küster 1926, 1929, Henner 1934 u. a.).

Versuchsprotokolle

Pholiota squarrosa (Pers. ex. Fr.) Quél.: Mittel, 10. 10. 1956. Frisch geprüllter Pilz, Traubenzuckerlösungen. Plasma in ganz wenigen Zellen mächtiger entwickelt, zumeist unsichtbarer Wandbelag. — Derselbe Pilz am 11. 10. 1956: Plasma in allen Zellen sehr voluminös, homogen, sehr viele Vakuolen. — Jung, 24. 10. 1956: Paraffinöl. Zellen mit vielen Vakuolen ohne Plasmaquellung. Zellen mit 1 oder 2 Vakuolen mit voluminösem Plasma. — Alt, 24. 10. 1956: Paraffinöl. Plasma in fast allen Zellen sehr voluminös. Abb. 3 a. — Sehr alt, lang gelagert, 26. 10. 1956: Dest. Wasser. Noch lebende Zellen mit sehr voluminösem Plasma und vielen Vakuolen. Abb. 3 b. — Jung, sehr lange gelagert, 26. 10. 1956: Dest. Wasser. Plasma fast durchwegs stark voluminös entwickelt.

Psalliota campestris L., Kultur: Mittel, 24. 4. 1956. Paraffinöl. Plasma bereits zu Beginn der Untersuchung in einzelnen Zellen ziemlich voluminös, weiterhin keine Veränderung. — Mittel, lange gelagert, 17. 3. 1956: 0,9 mol TRZ. Plasma homogen, stark lichtbrechend, sehr voluminös.

Clitocybe laccata var. *proxima* (Scop.) Bolt: Mittel, 22. 10. 1956. Paraffinöl. Plasmabelag dünn. Abb. 1 e, f. — Derselbe Pilz, 27. 10. 1956: Dest. Wasser. Nicht die geringste zusätzliche Plasmaquellung.

Limacium eburneum (Bull.): Jung, 22. 10. 1956. Paraffinöl. Plasmabelag dünn. Abb. 1 d. — Derselbe Pilz, 27. 10. 1956: Plasma unverändert.

Geringe Plasmamassen bei jungen Pilzen und mächtige bei alten Exemplaren konnten bei *Hypholoma sublateritium* (Fr.) Quél. (jung, mittel, alt), *Mycena pura* (Pers. ex Fr.) Quél. (mittel, sehr alt), *Clitocybe odora* (Bull. ex Fr.) Quél. (alt) und *Clitocybe lituus* (Fr.) Metr. (mittel) beobachtet werden.

Psalliota campestris L. Freiland: Mittel, 22. 5. 1956. Dest. Wasser. Plasmabelag sehr dünn. — Derselbe Pilz in 1,0 mol KNO_3 . Augenblicklich krampfartige Plasmolyse. Vakuolen kontrahieren sich durch Wasserabgabe an Plasmolytikum und gleichzeitig an Plasma. Plasma quillt auf. Kappenplasmolyse im eigentlichen Sinn nicht gebildet. Protoplasten nach mehreren Stunden konvex.

Psalliota campestris L. Kultur: Mittel, 15. 2. 1957. 0,6 mol KNO_3 , 5 Stunden. Starke Schädigung. Normale Protoplasten mit starker Quellung. Keine Kappenplasmolyse. Einzelne Zellen verschieden. Abb. 5 a. — Derselbe Pilz, 0,6 mol CaCl_2 . Plasma etwas weniger voluminös. Einzelne Zellen sehr verschieden. — Gleiches Ergebnis in 0,6 mol TRZ. Abb. 5 b.

Versuchsergebnisse

1. Der Quellungsgrad scheint eine dem Protoplasma jeweils eigentümliche Eigenschaft zu sein. Die Plasmaquellung kommt nicht erst während der Behandlung mit Wasser und verschiedenen Lösungen zustande und ändert sich auch in diesen Medien nicht innerhalb von 24 Stunden.

2. Normalerweise haben junge Zellen nicht oder nur wenig voluminöses Plasma. Bei mittelalten Pilzen nimmt das Volumen des Plasmas in der Regel zu. Alte Pilze zeigen besonders mächtig entwickeltes Plasma. Die

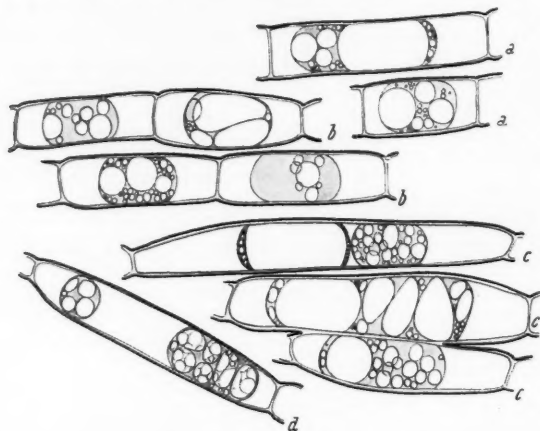


Abb. 5. *a* *Psalliota campestris* — mittel — 1,0 mol KNO_3 — schwache zusätzliche Plasmaquellung. *b* *Psalliota campestris* — mittel — 1,0 und 0,6 mol TRZ — verschieden starke Quellung und Schaumigkeit des Plasmas. *c* *Phlegmacium caesiocyaneum* — mittel — 0,7 mol TRZ — Konvexpasmolyse, stark schaumig.

Pilze verhalten sich vielfach gleich, ob sie nun am Standort im Freiland oder durch langes Lagern in Glasschalen gealtert sind.

Auch in ein und demselben Schnitt lassen sich Unterschiede der Plasmamächtigkeit bei den einzelnen Protoplasten feststellen. Diese erinnern an die Unterschiede der Vakuolenzahl in den Hyphenzellen.

3. Bei einzelnen Pilzarten wird die Plasmamasse auch im Alter nicht vermehrt (*Clitocybe laccata* var. *proxima* [Scop.] Bolt. *Limacium eburneum* [Bull.]).

Manchmal scheint das Plasma in Wundrandnähe zusätzlich gequollen zu sein.

5. Künstlich konnte nur mit KNO_3 eine geringe zusätzliche Plasmaquellung hervorgerufen werden. Niemals kam es dabei zu richtiger Kappenplasmolyse (vgl. Höfler 1928, 1934 u. a.). Die Quellung blieb auch bei Deplasmolyse erhalten. KNO_3 wirkte ausgesprochen schädlich.

Von besonderem Interesse waren die *Plasmolyseformen* und die morphologischen Veränderungen der Plasmakonfiguration infolge osmotischer Behandlung.

Kuchar untersuchte das Plasmolyseverhalten von *Oospora lactis* (K. Kuchar 1950). Er unterschied: 1. Hyphen mit solidem Plasmakörper, der konvex plasmolysierte und sich in langen Zellen teilte, 2. Hyphen mit zahlreichen Vakuolen im Plasma, die bis auf einen Rest verschwanden und erst bei Wasserzufuhr wieder normale Gestalt annahmen, und 3. Hyphen mit einer großen Vakuole, die in mehrere Teilvakuolen zerlegt wurde, welche die normale Gestalt behielten. Kirchheimer (1933) fand bei *Phycomyces*-Fruchthyphen während der Plasmolyse mit Rohrzucker- und KNO_3 -Lösungen vor allem Krampf- und Konkavformen. Plasmolyse von Zoosporen von *Saprolegnia* und *Achyla* mit Traubenzucker, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ und MgCl_2 und anderen Plasmolyticis verursachte eigenartige, tödliche Entmischungserscheinungen im Plasma (Lenz 1924).

Versuchsprotokolle

Clitocybe nebularis (Batsch. ex Fr.) Quél.: Sehr alt, 4. 11. 1955. 0,9 mol TRZ. 30 min. Plasma sehr viskos, Buchten, Krampfformen. Langsam Protoplastenenden abgerundet. Schließlich normale Konvexplasmolyse.

Hygrophorus leucophaeus (Scop.) Fr.: Alt, 15. 10. 1955. 1,0 mol CaCl_2 und KCl, 15 min. Krampfplasmolyse, sehr große Buchten. Protoplast zuerst an einem Zellende abgelöst, dann am zweiten. Nach weiteren 30 min. in tiefen Buchten Protoplastenteilung. Nach 35 min. Abrundung zur Konvexplasmolyse. Vakuolen selbst nie geteilt.

Phlegmacium tabulare Fr.: Alt, 27. 10. 1955. 0,8 mol TRZ. Rasch Eintritt der Krampfplasmolyse. Erste Abrundung nach 20 min., bei 40 min. noch nicht alle Protoplasten konvex. Nach $1\frac{1}{2}$ Stunden Plasma tot. Tonoplastenplasmolyse.

Psalliotia campestris L. Kultur: Alt, 14. 5. 1956. Durchsaugen der Lösungen. 0,2 mol TRZ. Hypotonisch. — 0,4 mol TRZ. Hypotonisch, Plasma liegt Membran an. — 0,5 mol TRZ. Verschiedenes Verhalten der einzelnen Protoplasten. Viele Zellen ohne Plasmolyse, manche mit Konvexplasmolyse. — 0,6 mol TRZ. Großteil plasmolysiert. Plasmastränge und -fäden. Konvexplasmolyse neben unplasmolysierten Zellen. — 0,7 mol TRZ. Einzelne Zellen noch unverändert. — 0,9 mol TRZ. Bisher unplasmolysierte Protoplasten mit Krampfformen von Zellwand abgehoben. Langsames Fortschreiten zur Abrundung. Schließlich alle Protoplasten konvex.

Starke Konkav- oder Krampfplasmolyse wurde weiters an alten Exemplaren von *Cortinarius suillus* Fr. (vgl. Lange III, S. 27), *Geaster fimbriatus* Fr. und *Psalliotia campestris* L. beobachtet.

Phlegmacium caesiocyaneum Britz.: Mittel, 11. 10. 1955. 0,7 mol TRZ. Lange Zellen mit Protoplastenteilung. Manchmal Tonoplast und Plasmalemma deutlich. Alte Schnitte mit Tonoplastenplasmolyse nach Absterben des Plasmas. Abb. 5 c.

Psalliotia campestris L. Kultur: Jung, 14. 3. 1956. 0,8 mol TRZ. Abhebung von Zellecken, dann Enden des Protoplasten abgerundet. Protoplastenteilung. Verbindungsstränge. Tonoplast manchmal gut zu sehen. Abb. 6, 7, 8.

Phlegmacium sulfarinum (Quél. Ricken: Mittel, 24. 10. 1955. 0,8 mol TRZ. Viele Teilprotoplasten mit nur einer Vakuole, Verbindungsfäden.

Dasselbe wurde bei *Lactarius deliciosus* (L. ex Fr.) Gray (mittel), *Mycena pura* (Pers. ex Fr.) Quél. (mittel), *Peziza*, sp. (mittel), *Phlegmacium aurantio-turbinatum* (Secr. ex Lge.) (mittel), *Phlegmacium nemorensis* (Fr. ex Lge.) (mittel),

Pholiota squarrosa (Pers. ex Fr.) Quél. (mittel), *Pluteus chrysophaeus* (Schaff. ex Lasch.) Quél. (mittel), *Polyporellus arcularius* (Batsch. ex Fr.) Pil. (mittel), *Tricholoma georgii* (Clus. ex Fr.) Quél. (jung) und *Tricholoma personatum* Fr. (mittel) beobachtet.

Psalliota campestris L. Kultur: Alt, 16. 3. 1956. 0,2 mol TRZ. Mehrere große Vakuolen, dazwischen in Plasmamenisken dicht gedrängt kleine. Selbst nach 24 Stunden im selben Medium keine Erhöhung der Vakuolenzahl.

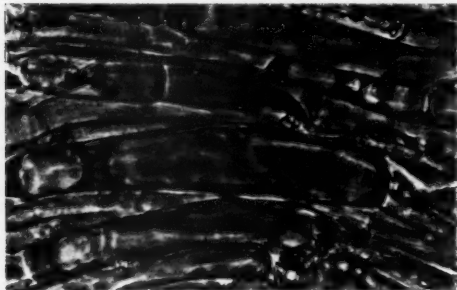


Abb. 6. *Psalliota campestris* — 0,4 mol TRZ — noch keine Plasmolyse.

Clitocybe geotropa (Bull. ex Fr.) Quél.: Jung, 13. 10. 1955. 0,1 mol TRZ. Mehrere große Vakuolen, in Plasmazwickeln kleine. Während einer Stunde nichts verändert.

Tricholoma sulphureum (Bull. ex Fr.) Quél.: Jung, 8.—11. 11. 1955. 0,4 mol TRZ. Wenig schaumiges Plasma. Nach 24 Stunden nur 1 oder 2 Vakuolen in Zelle, ebenso

nach 48 Std. Nach 72 Std. alle Zellen dem Absterben nahe. Jetzt Vakuolenzahl bedeutend gestiegen.

Psalliota campestris L. Kultur: Mittel, 25. 4. 1956. 0,7 mol TRZ. Plasma sehr schaumig, aber nicht mehr als in Paraffinöl. In 45 min. keine Veränderung.

Phlegmacium caesiocyaneum Britz. Mittel, 11. 10. 1955. 0,7 mol TRZ und 1,0 mol TRZ. Sehr stark und weniger stark zerteiltes Vakuum nebeneinander. Nach 24 Std. keine Veränderung.

Limacium chrysodon Batsch ex Fr.: Sehr jung, 14.—15. 11. 1955. Frost. 0,8 mol TRZ. Plasma schwach schaumig, große Hauptvakuole von vielen kleinen Bläschen umgeben. Schon nach 24 Std. alle Zellen mit vielen Vakuolen.

Tricholoma sulphureum (Bull. ex Fr.) Quél.: Alt, 8. 11. 1955; 0,7 mol TRZ. In Plasmamenisken viele kleine Vakuolen, nach 24 Std. keine Vermehrung.

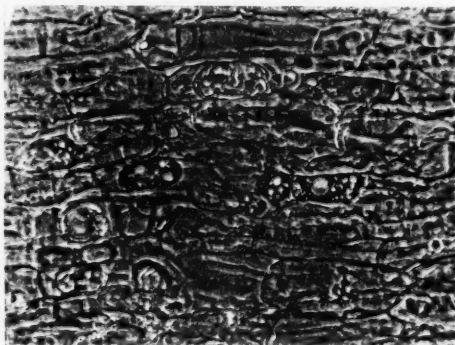


Abb. 7. *Psalliota campestris* — 1,0 mol TRZ — sehr gute Plasmolyse mit geteilten Protoplasten.

Die Wirkung hypotonischer Lösungen wurde weiters an *Phlegmacium nemorense* (Fr. ex Lge.) (mittel) und *Limacium eburneum* (Bull.) (mittel) untersucht, die Wirkung hypertonischer Lösungen an *Peziza* sp. (mittel), *Polyporellus arcularius* (Batsch ex Fr.) Pil. (mittel), *Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Quél. (jung, mittel), *Pholiota squarrosa-adiposa* Lge. (mittel), *Hypholoma sublateritium* (Fr.) Quél. (alt), *Phlegmacium sulfurinum* (Quél.) Ricken (mittel), *Phlegmacium aurantio-turbinatum*

(Secr. ex Lge.) (mittel), *Stropharia aeruginosa* (Curt. ex Fr.) Quél. (jung, mittel), *Limacium eburneum* (Bull.) (mittel), *Clitocybe nebularis* (Batsch. ex Fr.) Quél. (mittel) und *Clitocybe geotropa* (Bull. ex Fr.) Quél. (jung).

Ergebnisse der Plasmolyseversuche

1. Der Eintritt der Plasmolyse erfolgt bei frischen, nicht zu alten Pilzen zumeist 30 bis 120 Sekunden nach dem Einlegen in das Plasmolytikum.

Der Protoplast hebt sich dabei in der Regel von den Ecken zuerst, hierauf von den Zellenden (positive Plasmolyseorte) ab und zieht sich im Zentrum der Zelle zusammen. Manchmal haftet ein Protoplast jedoch an einem Zellende und wird in dessen Zellhälfte verlagert.

Bei sehr langen Zellen hebt sich der Plasmaschlauch bei normaler Plasmolyse an manchen Stellen der Längswände ab, wodurch Buchten und später Teilprotoplasten entstehen.

2. In jungen und mittellalten, frischen Pilzen tritt alsbald Konvexpasmolyse ein.

3. In langen Hyphenzellen werden die Protoplasten zumeist geteilt. Die Teilung erfolgt aber nicht an Stellen vorhandener Vakuolen, sie geht viel-

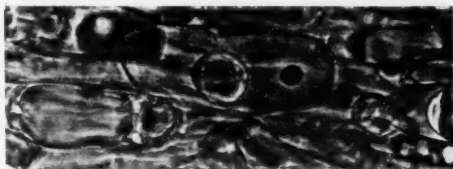


Abb. 8. *Psalliota campestris* — 0,6 mol TRZ — geteilte Protoplasten mit Verbindungsfäden.

mehr von Buchten längs der Zellwände aus, die beim Plasmolyseeintritt zustandekommen. Häufig bilden sich zwischen den Teilprotoplasten Verbindungsfäden des Plasmalemmas aus. Sie bleiben bei frischen Pilzen nur kurze Zeit, bei alten jedoch oft sehr lange bestehen.

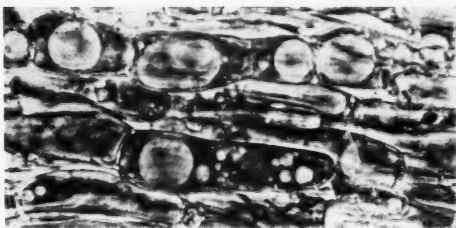


Abb. 9. *Psalliota campestris*, Kultur — mittel — aqua dest. — starke Vakuolisierung, schwach voluminöses Plasma.

4. Beim Abheben des Plasmas von den Zellwänden gibt es oft Hechtsche

Fäden. Sie bleiben besonders bei alten Pilzen lange erhalten.

5. In alten oder sehr lange gelagerten Pilzen erfolgt der Plasmolyseeintritt stets viel später (bis zu 10 Minuten und mehr). Zunächst gibt es Krampfplasmolyse. Der Protoplast wird von tief eingreifenden Buchten häufig geteilt. Bis zum Beginn der Abrundung des Protoplasten können 1 ½ Stunden vergehen. In den meisten Objekten kommt es schließlich zur Konvexpasmolyse. Ganz altes Plasma zeigt öfters eckige Plasmolyse, bei der die nicht abgerundeten Protoplasten an drei Seiten von den Zellwänden abgehoben sein können.

Das Haftvermögen des Plasmas alter Zellen ist bisweilen so hoch, daß die Zellwände bei Plasmolyse eingedellt werden.

Eine sehr auffällige Erscheinung ist das verschiedene Verhalten nebeneinander liegender Hyphenzellen und sogar der Protoplasten ein und derselben Hyphenzelle alter Pilze gegenüber hypertonischen Lösungen: Es gibt plasmolysierte und völlig unplasmolysierte Protoplasten nebeneinander.

6. Falls während des Plasmolyseverlaufes die Zellen absterben, geht zuerst das Binnenplasma zugrunde. Es haftet in Form stark lichtbrechender Körnchen dem noch kräftig plasmolysierten Tonoplasten an. Das Stadium der Tonoplastenplasmolyse kann stundenlang erhalten bleiben.

7. Deplasmolyse ist bei frischen Pilzen leicht durchzuführen. Bei alten Pilzen dauert es sehr lange, bis eine völlige Entspannung des Protoplasten erreicht ist.

8. Bei frischen, frostungeschädigten Pilzen tritt sowohl in hypo- als auch in hypertonischen Lösungen niemals eine Erhöhung der Vakuolenzahl innerhalb von 40 Stunden ein, während welcher der Plektenchymschnitt in den Lösungen gelegen ist.

Etwa nach 48 Stunden Aufenthalt in den Lösungen zeigt sich eine deutliche Vermehrung der Vakuolen im Plasma. Die Struktur des Protoplasten entspricht der frisch untersuchter, aber alter oder lange gelagerter Pilze.

9. Frosteinwirkung beeinflusst die Pilze derart, daß auch Exemplare mit ursprünglich geringer Vakuolenzahl bereits nach 24 Stunden in hypertonischen Lösungen eine starke Erhöhung der Vakuolenzahl aufweisen. Wieder entspricht das Bild dem alter Plektenchymschnitte.

Das normale, frische Pilzplasma verhält sich also bei Plasmolyse ganz entsprechend wie Plasma ähnlich gebauter Zellen höherer Pflanzen (vgl. E. Weber 1924, 1929a, 1929b, E. Küster 1929, K. Höfler 1932, 1952 u. a.). Traubenzuckerlösungen sind für das Pilzplasma unschädlich.

Die Kenntnis des Nekrosevorganges des Pilzplasmas ermöglicht es, auch ohne Plasmolyse über den Lebenszustand des Protoplasten entscheiden zu können. Beiträge zur Nekrose des Pilzplasmas lieferte Balbach (1938, 228). Ulehla und Moravek (1922, 8) untersuchten die Nekroseerscheinungen bei Einwirkung von Säuren auf *Basidiobolus ranarum* Eid.

Ich untersuchte als Modell die Nekroseerscheinungen bei *Psalliota campestris* L., Kultur. Sie verläuft ganz so wie die der Freilandpilze. Die Schnitte wurden bis zum völligen Absterben des Protoplasmas in zumeist hypotonischen Traubenzuckerlösungen belassen und alle 24 Stunden mikroskopisch untersucht.¹ Es ergaben sich nacheinander die folgenden mikroskopischen Bilder:

1. Das Protoplasma granuliert schwach und wird weniger lichtdurchlässig. Der Tonoplast ist deutlich als Grenzlamelle zwischen Zellsaft und

¹ Diese Lösung wurde gewählt, weil sehr viele andere Untersuchungen in Traubenzuckerlösungen vorgenommen werden sollten; außerdem wurde vermutet, daß hypotonische Lösungen weniger schädlich wären als reines, destilliertes Wasser oder Leitungswasser.

Vakuole zu erkennen. Die Schaumstruktur des Plasmas ist voll erhalten. Die Vakuolen sind straff gespannt. Der Protoplast liegt der Zellmembran überall an (Abb. 10 a).

2. Nun wird das Plasma grobkörnig und stärker lichtbrechend. Es liegt der Zellmembran noch allseits an. Die Vakuolen sind von deutlich sichtbaren Membranen umschlossen, verlieren jedoch ihre straffe Form (Abb. 10 b).

3. Die Struktur des Plasmas ist gegenüber 2 unverändert. Der Protoplast hebt sich aber von den Längswänden der Zelle ab und haftet nur

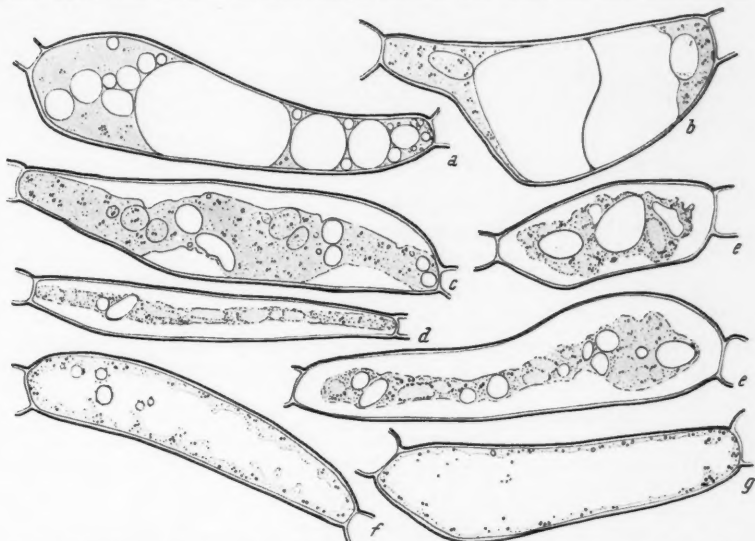


Abb. 10. a Absterbevorgang des Plasmas bei *Psalliotia campestris* — alt — 24 Stunden in 0,2 mol TRZ — Zahl der Vakuolen nicht verändert. Plasma granuliert. b Plasma grobkörnig. c Protoplast kontrahiert. d Vakuolen schwinden. e Absterbevorgang in 0,7 mol TRZ. f Auflösung des Plasmas in Krümel und Schollen. g Plasma völlig zerstört.

mehr an den beiden Enden. Die Umrifflinie des Protoplasten ist unregelmäßig. Vakuolen sind noch in großer Zahl vorhanden. Sie sind mit unregelmäßigen Konturen zusammengeschrumpft (Abb. 10 c).

4. Die Vakuolen verschwinden immer mehr. Das Plasma ist als schmaler Strang in der Zellmitte von einem zum anderen Zellende ausgespannt. Bei Objekten in hypertonischen Lösungen, bei welchen der gesamte Absterbevorgang ähnlich verläuft, ist der Protoplast natürlich auch an den beiden Zellenden abgehoben (Abb. 10 d, e).

5. Das Plasma ist in mehr oder minder kleine Klümpchen zerfallen. Diese liegen vor allem den Zellwänden an. Im Zellinneren befinden sich noch einzelne, verstreute Bläschen, die Reste der Vakuolen (Abb. 10 f).

6. Das Endstadium der Nekrose ist erreicht, wenn das Plasma völlig körnelig aufgelöst ist (Abb. 10 g).

III. Zur Vitalfärbung von Pilzhypen

Vitalfärbung mit Neutralrot: Guilliermond und P. A. Dangeard färbten *Penicillium glaucum*, *Endomyces*, *Saccharomyces Ludvigii* u. a. und beschrieben die bekannten Entmischungsvorgänge. Die dabei entstehenden Entmischungströpfchen nannten sie „Corpuscules métachromatiques“ (A. Guilliermond 1901, 1920, 1929, 1930, P. A. Dangeard 1916, 1931). F. v. Hofe erzielte bei schwach alkalischer Reaktion der Farblösung Vakuolenfärbung mit Neutralrot in Fruchtkörperhypen von *Psalliota campestris* (F. v. Hofe 1933). H. Johannes (1939) färbte *Phycomyces blakesleeana*, *Basidiobolus ranarum* und *Saprolegnia* mit Neutralrot und beschrieb die Bildung der kirschroten Entmischungströpfchen. Ähnliche Ergebnisse brachten die Versuche mit *Achylya racemosa* (H. Johannes 1954).

Versuchsprotokolle

Neutralrot: Heilmittelwerke Wien, in Phosphatpuffern, Verhältnis 1 : 10.000. Die Schnitte wurden jeweils 10 bis 15 Minuten in der Farblösung gelassen, hierauf mit entsprechender farbloser Pufferlösung ausgewaschen und mikroskopisch im Hellfeld oder UV-Licht untersucht.

Camarophyllus leporinus (Fr.) Karst.: Mittel, 20. 11. 1954. pH 7,8. Ziegelrote Vakuolenfärbung, schwach bis intensiv.

Clitocybe laccata (Scop.) Bolt.: 14. 9. 1955. pH 3,95. Membran rosa. Plasmolyse mit 1,0 mol CaCl₂. Membranen sofort entfärbt. pH 9,8. Vakuolen in breiten Hyphen schwach rosa, in engen Hyphen leuchtend rot.

Geaster fimbriatus Fr.: 30. 9. 1955. Äußere Peridie. pH 2,12. Membranfärbung fast nicht merkbar. — pH 2,38. Stark rote Membranen. — pH 7,1. Noch schwache Membranfärbung. Einzelne Zellen mit hellroten Vakuolen. — pH 7,5. Vereinzelt rötliche Membranen. Fast alle Zellen mit ziegelroten Vakuolen. — pH 8,3. Intensive Vakuolenfärbung. — pH 9,8. Ziegelrote Vakuolenfärbung. Abb. 11 a, b, c.

Psalliota campestris L. Kultur: 2. 7. 1955. pH 2,12. Schwach rosa Membranfärbung. — pH 6,8. Starke Membranspeicherung, vereinzelt schwache Vakuolenfärbung mit Entmischungströpfchen. — pH 7,1. Ziegelrote Vakuolenfärbung.

Psalliota campestris L. Kultur: 27. 9. 1956. pH 8,3, 15 min. Diffuse, ziegelrote Vakuolenfärbung. In normalen Zellen Entmischung des Farbstoffes. In den vielen, kugelförmigen, stark gefärbten Vakuolen liegen nach 20 min. einzelne rote Entmischungstropfen. Farbe tritt allmählich aus Vakuolen ins Plasma über. Vakuolen blassen dabei aus. Nach einer Stunde treten die Entmischungströpfchen häufig zu großen Kugeln zusammen, die im Plasma liegen und kleinen, leuchtend roten Vakuolen ähneln. Andere Entmischungströpfchen bleiben noch in den Vakuolen. Abb. 11 d, Abb. 12.

Hellfeldfärbung mit Neutralrot wurde weiters durchgeführt an: *Boletus chrysenteron* [*Xerocomus chrysenteron* (Bull. ex Fr.) Quél.], *Boletus satanas* Lenz, *Clitocybe geotropa* (Bull. ex Fr.) Quél., *Clitocybe nebularis* (Batsch ex Fr.) Quél., *Hebeloma crustuliniforme* (Bull. ex Fr.) Quél., *Mycena pura* (Pers. ex Fr.) Quél., *Phlegmacium caesiocyaneum* Britz, *Phlegmacium nomorense* (Fr. ex Lge.), *Pleurotus columbinus* Quél., *Russula persicina* Krbh. et Melz. et Zr., und *Tricholoma terreum* (Schaeff. ex Fr.).

Psalliota campestris L. Kultur: 27. 9. 1956. Neutralrot, pH 8,3, UV-Licht. Membranen mit silbergrüner Eigenfluoreszenz. Im Hellfeld intensiv rot gefärbte Va-

kuolen fluoreszieren matt dunkelrot. Plasma leuchtet gelbgrün. — pH 3,1. Membranen und Vakuolen optisch leer. Plasma fluoresziert gelbgrün.

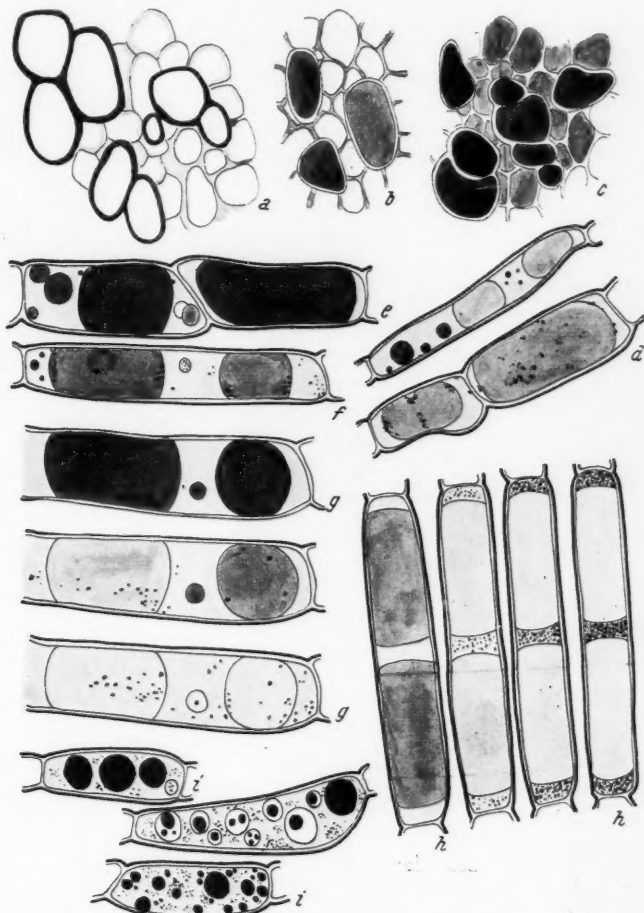


Abb. 11. a *Geaster fimbriatus*, äußere Peridie — Neutralrot, pH 6,8 — rote Membranfärbung. b *Geaster fimbriatus*, äußere Peridie — Neutralrot, pH 7,5 — beginnende Vakuolenfärbung. c *Geaster fimbriatus*, äußere Peridie — Neutralrot, pH 11,2 — Vakuolenfärbung. d *Psalliotia campestris* — Neutralrot, pH 8,3 — Entmischungsvorgang. e *Psalliotia campestris* — Neutralrot, pH 11,22 — leuchtend ziegelrote Vakuolenfärbung. f *Psalliotia campestris* — Neutralrot, pH 10,7 — Entmischungstropfen in Vakuole und Plasma. g *Psalliotia campestris* — Toluidinblau, pH 11,2 — Verlauf der Entmischung in einer Zelle. h *Psalliotia campestris* — Toluidinblau, pH 11,2 — Entmischungsvorgang mit ausschließlicher Speicherung des Farbstoffes im Plasma. i *Psalliotia campestris* — Toluidinblau, pH 11,2 — Entmischung in wundrandnahen Zellen.

Versuchsergebnisse

1. Von pH 2,12 bis 7,1 herrscht Membranfärbung, beginnend mit zartem Rosa, in kräftiges Rot übergehend und schließlich ausblassend. Diese Membranfärbung ist nicht salzfest.

2. Vakuolenfärbung tritt in einzelnen Zellen bei pH 6,8 auf. Nach dem Umschlagspunkt des Farbstoffes bei pH 7 sind alle Vakuolen gefärbt. Diese Färbung findet sich im ganzen alkalischen Bereich. Sie ist ziegelrot und diffus. Mit NH_3 läßt sich die Vakuolenfärbung völlig entfernen.

3. Nach etwa 20 Minuten kommt es zu Entmischungerscheinungen, bei denen die Vakuolen ausblassen. Die entstehenden Entmischungströpfchen sammeln sich zunächst an den Vakuolenenden; nach einiger Zeit finden sie sich auch im Plasma. So-

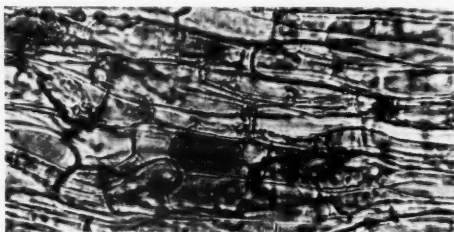


Abb. 12. *Psalliotia campestris* — Neutralrot, pH 7,8 — Vakuolenfärbung mit Entstehung von Entmischungströpfchen.

wohl im Plasma als auch im Zellsaft sind sie häufig in Brownscher Molekularbewegung. Nach einer Stunde fließen viele Entmischungströpfchen zu großen Tropfen zusammen. Diese liegen entweder in der Vakuole oder im Plasma.

4. Im Hellfeld ist niemals Plasmafärbung zu beobachten. Dagegen zeigt das Protoplasma im UV-

Licht vom sauren bis weit in den alkalischen Bereich eine gelbgrüne Fluoreszenz, die wohl als Sekundärfluoreszenz aufzufassen ist (vgl. Drawert und Metzner 1955).

Besprechung

Pilzzellen zeigen mit Neutralrot dasselbe Färbebild wie Zellen höherer Pflanzen. Solange in der Farblösung vor allem Ionen des Farbsalzes vorhanden sind, wird bloß die Membran elektroadsorptiv gefärbt. Nach pH 7, dem Umschlagspunkt, gibt es in der Farblösung immer mehr Moleküle der Farbbase, die durch das Plasma in den Zellsaft permeieren können. Der Zellsaft färbt sich durch erneuten Zerfall dieser Moleküle in Ionen (vgl. Höfler 1947, Kinzel 1954) ziegelrot.

Die ziegelrote Färbung der Vakuolen ist kennzeichnend für „leere“ Zellsäfte (K. Höfler 1947 a, A. Toth 1951).

Auch der Versuch mit NH_3 , bei dem der Zellsaft alkalisch gemacht wird und die wiedergebildeten Moleküle aus der Vakuole erneut exosmieren können, beweist, daß keine chemische Bindung des Farbstoffes an irgendwelche Stoffe des Zellsaftes vorliegt.

Die Fluoreszenz des Protoplasmas kommt dadurch zustande, daß die Moleküle der Farbbase im lipoiden Anteil des Cytoplasmas gelöst werden. Im Hellfeld reicht der schwache, hellgelbe Ton der Farbbase jedoch nicht zur Farbwahrnehmung aus (S. Strugger 1940).

Vitalfärbung mit Toluidinblau wurde bei Pilzen bereits mehrmals durchgeführt. A. Th. Czaja (1936) fand an *Phycomyces blakesleeana*, *Abidia coerulea*, *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. Ludwigii*, *Boletus*, *Mycena*, *Russula* und *Clitocybe* sp. rotviolette Membranfärbung im sauren Bereich. Höfler und Pecksieder (K. Höfler und E. Pecksieder 1947) konnten bei *Russula* ebenfalls rotviolette Färbung feststellen, während sich einige *Tricholoma*-Hyphen himmelblau färbten.

Versuchsprotokolle

Toluidinblau stand. „Bayer“, Leverkusen, in Phosphatpuffern 1 : 10.000.

Clitocybe nebularis (Batsch. ex Fr.) Quél.: 5. 7. 1955. pH 2,12. Alle Membranen schwach blau. Durch CaCl_2 rasch entfärbt. — pH 4,8. Stark violette, einheitliche Membranfärbung. — pH 7,1. Stark violette Membranfärbung. Plasma ungefärbt. Einzelne Zellen mit schwacher Vakuolenfärbung. — pH 11,2. Vakuolen diffus violett. Nach längerer Zeit tröpfchenförmige Entmischung in der Vakuole, blaue Krümel im Plasma. Membranen optisch leer.

Phlegmacium sulfurinum (Quél.) Ricken: 25. 10. 1955. pH 4,8. Membranfärbung, nicht salzfest. Plasma in einzelnen Zellen abgestorben, Vakuolen von Tonoplasten umschlossen; enthalten reichlich Farbstoff. Vakuolen in intakten Protoplasten leer.

Psalliota campestris L. Kultur: 29. 10. 1956. pH 11,2. Vakuolenfärbung. Plasma zwischen Vakuolen vollkommen farblos. Allmählich im Plasma stark gefärbte Entmischungströpfchen; Färbung der Vakuole nimmt ab. Nach 10 min. nur mehr im Plasma blauviolette Tröpfchen. Weitere 20 min. Tröpfchen im Plasma blau. Abb. 11 h.

Psalliota campestris L. Kultur: 30. 10. 1956. pH 11,2. Wundrandnahe Zellen. Vakuolen intensiv violett. In Plasma und Vakuole alsbald erste, dunkle Entmischungströpfchen, in BMB. Treten in Vakuolen zu stark umgrenzten, lebhaft gefärbten Kugeln zusammen, während übrige Vakuolenfärbung ausblaßt. Im Plasma außer Tröpfchen auch Krümel gefärbt. Schließlich erfüllen nur mehr verschieden große, intensiv gefärbte, rotviolette Tropfen die Zelle; mehr oder weniger dicht beisammen, dazwischen blaue, kleine Krümel in BMB. Keine Gliederung in Zellvakuole und Plasma. Abb. 11 i.

Weitere Versuche wurden an *Craterellus cornucopioides* (L.) Fr., *Limacium queletii* (= *Hyrophorus queletii* Bres.), *Marasmius* sp., *Phlegmacium sulfurinum* (Quél.) Ricken, *Pluteus chrysophaeus* (Schaeff. ex Lasch.) Quél., *Polyporellus* sp. und *Ramaria flava* (Schaeff. ex Fr.) durchgeführt.

V Versuchsergebnisse

1. Die Membranfärbung im sauren Bereich ist blauviolett und nicht salzfest. Der Umschlag zur Vakuolenfärbung erfolgt nie so plötzlich wie mit Neutralrot, sondern erstreckt sich über den Bereich von pH 7,1 bis 10,7. Die Vakuolenfärbung ist diffus blauviolett in wechselnder Stärke.

2. Die normalen Entmischungsvorgänge an gesunden Zellen verlaufen wie bei Neutralrot. Dabei blassen die Vakuolen schließlich ganz aus, während das Plasma von kleinen Entmischungströpfchen erfüllt ist.

3. In Wundrandnähe gibt es eine zweite Art der Entmischung, als deren Endzustand im Plasma regellos nebeneinander große Farbtropfen und kleine gefärbte Krümel liegen. Entsprechend ihrer Größe sind sie in mehr oder minder heftiger Brownscher Molekularbewegung.

4. Sobald das Binnenplasma abgestorben ist, werden die Tonoplasten im sauren Bereich für den Farbstoff durchlässig. Die Vakuolen färben sich blau.

5. Toluidinblau wirkt innerhalb einer Stunde tödlich auf das Plasma. Ganz besonders auffallend sind die rasch erfolgenden Entmischungs- und Nekroseerscheinungen in wundrandnahen Zellen.

Hellfeldfärbung mit Nilblausulfat. Nilblausulfat erwies sich für *Aspergillus niger* (R. A. Steinberg 1940) und *Oidium lactis*

(A. Guilliermond 1930) als stark giftig. Kräftige Speicherung des Farbstoffes in der Vakuole bei alkalischen Lösungen fanden A. Guilliermond und Gautheret (1940) bei Hefe, *Saprolegnia*, *Penicillium* und *Oidium lactis*.

V Versuchsergebnisse

Nilblausulfat Dr. G. Grubler & Co., Leipzig, in Phosphatpuffern 1:10.000, 15 Minuten.

Psalliotia campestris L. Kultur: 26. 9. 1956. pH 2,12. Ganz schwache, hellblaue Membranfärbung. — pH 2,38. Membranfärbung etwas verstärkt. Geschädigtes Plasma wird hellblau, gesundes farblos. — pH 3,95. Tiefblaue Membranen, Plasma und Vakuolen leer. — pH 4,8. Violette Membranen. — pH 7,5 Blauviolette Membranen. Einzelne Vakuolen schwach violett. — pH 10,7. Schwach violette Vakuolenfärbung. Membranen farblos. Im Plasma blaue Krümel.

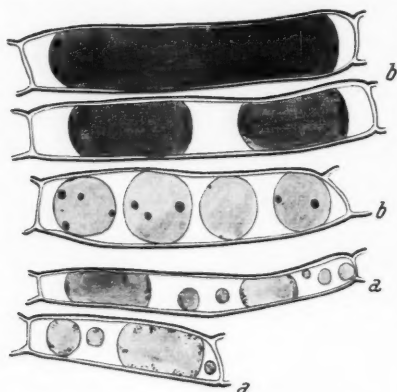


Abb. 13. a *Psalliotia campestris* — Nilblausulfat, pH 7,8 — Vakuolenfärbung mit Entmischungstropfen. b *Pluteus chrysosphaeus* — Nilblausulfat, pH 11,2 — Vakuolenfärbung mit Entmischungsformen.

Einzelne Vakuolen schwach violett. — pH 10,7. Schwach violette Vakuolenfärbung. Membranen farblos. Im Plasma blaue Krümel.

Psalliotia campestris L. Kultur: 5. 10. 1956. pH 7,8. Diffuse, blauviolette Vakuolenfärbung. Allmählich tröpfenförmige Entmischung mit Entfärbung der Vakuole. Tröpfchen an Enden der Vakuole, treten nicht ins Plasma über. Erst bei Absterben des Plasmas wird dieses blau durch Krümelspeicherung. Abb. 13 a.

Weitere Färbungen mit Nilblausulfat an *Coprinus micaceus* (Bull. ex Fr.) Fr., *Phallus impudicus* L. ex Fr., *Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Quél. und *Pluteus chrysosphaeus* (Schaeff. ex Lasch.) Quél. Abb. 13 b.

Aus diesen Versuchen ergab sich:

1. Membranfärbung bis pH 7,1; blau bis blauviolette Vakuolenfärbung ab pH 7,5.

2. Die Entmischung verläuft in 2 Typen: a) Ganz gesunde Zellen zeigen lange Zeit farbloses Plasma. In den diffus gefärbten Vakuolen bilden sich zahlreiche, violette Tröpfchen, die vor allem an die Vakuolenwände angelagert sind, oft zu größeren Tropfen zusammentreten, aber die Vakuolen nicht verlassen. Erst beim Absterben nimmt das Plasma den Farbstoff auf und entzieht ihn weitgehend den Tröpfchen in den bereits blassen Vakuolen.

b) Bestehen im Plasma bereits vor der Färbung Krümel oder Tröpfchen, so speichern diese den Farbstoff so stark, daß die Vakuolen von Anfang an blaß bleiben. Die Entmischungerscheinungen verursachen ein weiteres Anfärben von Plasmakrümel. Nur einzelne Tröpfchen zeigen auch in der Vakuole kräftige Färbung. Solche Färbebilder gab es in bereits leicht nekrotischen Zellen.

Fluorochromierung mit Acridinorange. Höfler und Pecksieder (1947) untersuchten an Fruchtkörperhyphen von *Russula*-Arten die Lage des isoelektrischen Punktes und verglichen sie mit der Lage bei Blütenpflanzen desselben Standortes. H. Johannes (1950) konnte an Hyphen von *Phycomyces blakesleanus* die bereits von höheren Pflanzen bekannten Färbebilder mit Acridinorange finden. Er stellte weiters fest, daß Acridinorange für Kulturen von *Achyta racemosa* im sauren Bereich schädlich wirkte (H. Johannes 1954). Dagegen setzten S. Struggers (1941) Kulturen von Myxamöben von *Didymium nigripes* ihren normalen Entwicklungszyklus trotz der Bindung des Farbstoffes an das Eiweißgerüst des Cytoplasmas und Kernes fort. Mit Hilfe von Acridinorangefärbung konnte S. Struggers (1943) zwischen lebendem und totem Plasma von Hefezellen unterscheiden.

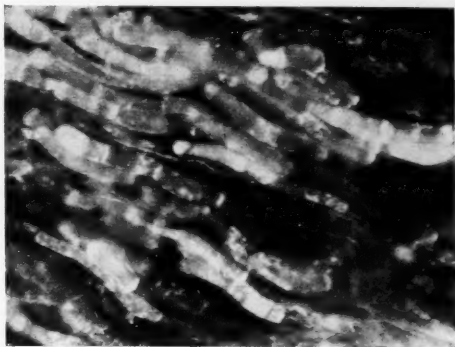


Abb. 14. *Psalliotia campestris* — Acridinorange, pH 8,3 — im bereits geschädigten Plasma starke, orangerote Fluoreszenz.

Versuchsprotokolle

Acridinorange, Dr. G. Grübler & Co., Leipzig, in Phosphatpuffern 1 : 10.000.

Clitocybe pithyophila (Secr.) Gill.: 17. 12. 1954. pH 2,12. Membranen zart grün. — pH 3,1. Membranen ohne Übergang plötzlich orange. — pH 3,95. Membranen orangerot. — pH 4,6. Membranen leuchtend kupferrot. — Bis pH 9,6. Leuchtend rote Membranfärbung. — pH 10,5. Orangerote Zellsaftfluoreszenz. Hellgrüne Kerne.

Hydrocybe bovis (Fr.): 25. 10. 1955. pH 8,3. Rote Vakuolenfluoreszenz, mit n/10 Ammoniak entfärbt.

Psalliotia campestris L. Kultur: 5. 12. 1956. pH 2,12. Membranen grün. Plasma und Vakuolen optisch leer. — pH 2,38. Membranen matt gelbgrün. Totes Plasma alpenglührot. — pH 2,56. Membranen orangegelb ohne grünen Stich. Plasma in vielen Zellen tiefgrün. Vakuolen leer. — pH 3,1. Membranen leuchtend orangerot. Plasma grün, totes Plasma gleißend kupferrot. — pH 3,95. Membranen kupferrot. Plasma grün. Vakuolen leer. — pH 6,4. Kupferrote Membranen, Plasma grün, Vakuolen leer. — pH 6,8. Im Randgebiet des Schnittes vereinzelt rote Zellsaftfluoreszenz.

Plasma überall grün. — pH 7,0. Plasma grün, Membranen kupferrot, Einzelne Zellen mit roten Vakuolen bei farblosen Membranen. — pH 7,5. Membranen schwach orangerot. Ein Teil der Vakuolen noch leer, sonst rot. Plasma grün. — pH 8,3. Membranen optisch leer. Plasma grün. Zellsäfte rot, Heller grüner Fleck im Plasma vermutlich Kern. Abb. 14. — pH 9,8. Gesundes Plasma gelbgrün, geschädigtes gleißend kupferrot. Vakuolen tiefrot. Membranen leer. — pH 10,7. Vakuolen tiefrot. Plasma gelbgrün. — pH 11,2. Gesundes Plasma schwach hellgrün. Vakuolen tief orangerot.

Dieselben Ergebnisse brachten Versuche mit *Geaster fimbriatus* Fr., *Phlegmacium caesiocyaneum* Britz und *Polyporellus versicolor*.

Versuchsergebnisse

1. Der isoelektrische Punkt (Entladungspunkt) der Zellmembranen der untersuchten Pilzexemplare liegt um pH 3,1. Es erfolgt Umschlag von grüner zu orangeroter Membranfluoreszenz. Bei pH 3,95 fluoreszieren die Membranen kupferrot.

2. Der Umschlag von Membran- zu Vakuolenfluoreszenz beginnt bei pH 6,8, ist aber oft erst bei pH 10,5 in allen Zellen erfolgt. Die Vakuolen fluoreszieren leuchtend orangerot. Ammoniak bringt die Fluoreszenz zum Verschwinden.

3. Bei allen Pilzen fluoresziert das Plasma von pH 2,56 an bis weit in den alkalischen Lösungsbereich hinein grün. Absterbendes und totes Plasma leuchtet intensiv rot.

4. Bei einzelnen Pilzarten fluoresziert der Kern im stark alkalischen Bereich grün. Bei *Psalliotia* ist dies nicht einwandfrei feststellbar.

Besprechung

Die Fluorochromierungsversuche zeigen, daß Pilzzellen etwa das gleiche Farbbild liefern wie Zellen höherer Pflanzen (vgl. K. Höfler 1947 a, b, 1949). Die Zellsäfte sind „leer“, daher orangerote Fluoreszenz.

Der Bereich zwischen grüner und kupferroter Membranfluoreszenz ist bei den Pilzen im Gegensatz zu Blütenpflanzen ziemlich breit, wie bereits von Höfler und Pecksieder beobachtet wurde (1947).

Die Speicherkonkurrenz der roten Zellsaftfärbung gegenüber der Farbbindung im Plasma ist stets so gering, daß kräftige Plasmafluoreszenz zu sehen ist. Das typische „Alpenglührot“, ein gleißendes Kupferrot, kann stets an abgestorbenem Plasma festgestellt werden. Nach K. Höfler (1947 b) handelt es sich dabei um Koagulationsnekrosen. Der rote Farbton selbst beruht auf einem Konzentrationseffekt. Das abgestorbene Plasma kann nämlich mit seinen vielen, frei gewordenen, sauren Endgruppen bedeutend mehr Farbkationen speichern als im lebenden Zustand bei hochgeordneter Molekularstruktur.

Über Plasmafärbung mit Uranin bei Pilzen bringen Höfler, Ziegler und Luhan (1956) eine kurze Notiz. Sie färbten Stielhyphen von *Cortinarius coeruleus* und *Phlegmacium aurantioturbinatum*.

Ich untersuchte *Phlegmacium caesiocyaneum* Britz (= *Cortinarius coeruleus*) und *Psalliotia campestris* L.; Uranin konz. Bayer, Leverkusen, in Phosphatpuffern 1 : 10.000.

Tote Hyphenzellen nahmen den Farbstoff nicht an. Lebendes Plasma fluoreszierte leuchtend gelbgrün. Besonders lebhaft war die Fluoreszenz in alten Pilzen mit sehr voluminösem Plasma.

Höfler und Pecksieder (1947) fanden grünlichblaue oder silberblaue Eigenfluoreszenz bei Pilzmembranen. Diese Farbe ist für keinen bestimmten Stoff charakteristisch. Ihre Intensität wechselte von Objekt zu Objekt.

Ich konnte diese Eigenfluoreszenz ebenfalls bei Untersuchungen im UV-Licht sehen. Sie wird an nicht fluorochromierten Präparaten sichtbar.

IV. Zusammenfassung

In den Hyphen von Fruchtkörpern der Hutpilze ist der Zellsaftraum oft in eine mehr oder minder große Anzahl von Teilvakuolen zerlegt. Das Plasma erhält dadurch eine schaumige Struktur. Diese ist sofort nach dem Schneiden des Plektenchyms in den Zellen zu sehen und verändert sich innerhalb von 24 Stunden nicht oder nur wenig durch die Einwirkung von destilliertem Wasser, von Farbstofflösungen und osmotisch wirksamen Medien.

Junges Plasma enthält in der Regel nur eine oder sehr wenige Vakuolen, altes Plasma jedoch sehr viele. Durch langes Lagern und Frosteinwirkung wird die Zahl der Vakuolen erhöht.

In den Zellen junger Pilze ist der Protoplasmanmantel ein kaum sichtbarer Wandbelag. Bei mittelalten Pilzen gibt es viele Zellen mit voluminös entwickeltem Plasma. Bei alten Pilzen ist das Protoplasma allgemein voluminös entwickelt. Es handelt sich hierbei anscheinend nicht um Vakuolenkontraktion durch Einwirkung destillierten Wassers oder der Farbstofflösungen.

Der Eintritt der Plasmolyse erfolgt bei frischen Pilzen, die noch nicht zu alt sind, sehr rasch, zumeist nach 30 bis 120 Sekunden. Bei jungen Pilzen ist es vielfach Konvexplasmolyse. In alten oder lange gelagerten Pilzen erfolgt der Plasmolyseeintritt recht allgemein viel später (10 Minuten und mehr). Krampfplasmolyse dauert in solchen Exemplaren bis zu 1½ Stunden. Dann erst rundet sich der Protoplast. Besonders altes Plasma zeigt eckige Plasmolyse. In alten Pilzen fällt überdies ein sehr ungleiches Verhalten der Protoplasten nebeneinander liegender Hyphenzellen auf (plasmolysiert und nicht plasmolysiert).

In besonders langen Hyphenzellen zerfällt der Protoplast bei Plasmolyse in mehrere Teilprotoplasten, die oft durch Plasmafäden miteinander verbunden sind.

Falls das Plasma während der Plasmolyse abstirbt, umschließen die noch wohl erhaltenen Tonoplasten stundenlang die unter dem Einfluß der wasserentziehenden Mittel kontrahierten Vakuolen.

Bei Versuchen mit den Hellfeldfarbstoffen Neutralrot, Toluidinblau und Nilblausulfat zeigt sich unterhalb des Umschlagspunktes Membranfärbung, die durch Zusatz von CaCl_2 ausgewaschen werden kann. Oberhalb des Umschlagspunktes tritt diffuse Vakuolenfärbung auf.

Mit Neutralrot entsteht ziegelrote Vakuolenfärbung — die Farbe der „leeren“ Zellsäfte. Nach einiger Zeit kann stets tropfenförmige Entmischung beobachtet werden. Im UV-Licht fluoresziert das Plasma bei Fluorochromierung mit Neutralrot gelbgrün, die Vakuolen leuchten schwach dunkelrot im alkalischen Bereich.

Mit Acridinorange fluoreszieren die Zellmembranen unterhalb pH 3,1 grün, darüber orangerot, allmählich kupferrot. Die Übergangszone von gelber zu kupferroter Membranfluoreszenz ist breit. Oberhalb pH 7,1 fluoreszieren die Zellsäfte orangerot. Die für „volle“ Zellsäfte charakteristische grüne Fluoreszenzfärbung wurde von mir nie beobachtet. Das Plasma fluoresziert von pH 2,12 an bis weit in den alkalischen Bereich hinein gelbgrün. Bei einzelnen Pilzarten ist grüne Kernfluoreszenz zu beobachten im stark alkalischen pH-Bereich.

Vollkommen normales Plasma speichert keinen der verwendeten Farbstoffe im Hellfeld. Kräftige Plasmafluoreszenz gibt es dagegen mit Acridinorange und Uranin, schwächere auch mit Neutralrot. Leicht pathologisch verändertes Plasma speichert die Farbstoffe auch schon im Hellfeld. Totes und stärker geschädigtes Plasma nimmt sie reichlich auf.

Die Zellwände der untersuchten Pilzarten zeigen silbergraue Eigenfluoreszenz.

Literatur

- Balbach, H., 1958: Beiträge zur Kenntnis der Nekrose pflanzlichen Protoplasmas. *Protoplasma* 29, 228—245.
- Buller, R., 1955: *Researches on Fungi*. 5. London.
- Chaze, J., et A. Sarazin, 1955: Altération des constituants cytoplasmiques provoquée dans le *Psalliotia* par le parasitisme. *C. R. soc. biol. Paris* 119, 843. Zit. bei Küster 1956.
- Czaja, A. Th., 1956: Untersuchungen über den Membraneffekt des Absorptionsgewebes und über die Farbstoffaufnahme in die lebende Zelle. *Planta* 26, 90.
- Dangeard, P. A., 1916: La métachromatine chez les Mucorinées. *Bull. Soc. myc. France* Zit. bei Guilliermond 1930.
- 1931: Mémoire sur la terminologie des éléments cellulaires et son application à l'étude des Champignons. *Le Botaniste* 22, 325.
- Degen, A. v., 1905: Untersuchungen über die kontraktile Vakuole und die Wabenstruktur des Protoplasmas. *Bot. Ztg.* 63, 163.
- Dubitzky, J., 1934: Protoplasma- und Vakuolenkonfiguration bei *Saprolegnia*. *Z. Mikrosk.* 51, 213.
- Guilliermond, A., 1901: Recherches sur la structure de quelques Champignons inférieurs. *C. r. Acad. Sci. Paris*. Zit. bei Guilliermond 1930.
- 1920: La métachromatine des Champignons. *C. r. Soc. biol. Zit. bei Guilliermond* 1930.
- 1929: Nouvelles observations sur la coloration vitale dans la cellule végétale. *C. r. Acad. Sci. Paris*. Zit. bei Guilliermond 1930.
- 1930: Le vacuome des cellules végétales. *Protoplasma* 9, 133.
- et Gautheret, 1940: Recherches sur la coloration vitale des cellules végétales. *Rev. gén. Bot.* 52, 5. Zit. bei H. Drawert 1952: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblausulfat. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 65, 263.
- Haas, H., 1951, 1953: *Pilze Mitteleuropas*. Bd. I und II. Stuttgart: Kosmos, Franckesche Verlagshandlung.

- Henner, J., 1934: Untersuchungen über Spontankontraktion der Vakuolen. *Protoplasma* 21, 81.
- Höfler, K., 1928: Über Kappenplasmolyse. *Ber. dtsch. bot. Ges.* 46, 73.
- 1932: Tonoplastenfrage. *Protoplasma* 15, 462.
- 1934: Kappenplasmolyse und Salzpermeabilität. *Z. Mikrosk.* 31, 70.
- 1947 a: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? *Mikroskopie* 2, 13.
- 1947 b: Einige Nekrosen bei Färbung mit Acridinorange. *S. B. Akad. Wiss. Wien, math.-natw. Kl., Abt. I*, 165, 585—644.
- 1948: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. *Mikroskopie* 46, Sonderband „Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie“, 46—70.
- 1949: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. *Biol. gen.* 19, 90—113.
- 1952: Zur Kenntnis der Plasmahautschichten. *Ber. dtsch. bot. Ges.* 65, H. 10.
- und E. Pecksieder, 1947: Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an höheren Pilzen. *Öst. bot. Z.* 94, 99.
- A. Ziegler, und M. Lühn, 1956: Fluorochromierungsstudien mit Uranin. *Protoplasma* 46, 322—366.
- Hofe, F. v., 1935: Permeabilitätsuntersuchungen an *Psalliotia campestris*. *Planta* 20, 354.
- Johannes, H., 1939: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien I. *Flora* 134, 58—104.
- 1950: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien III. Vitalfärbung von *Phycomyces blakesleeana* mit Acridinorange. *Arch. Mikrobiol.* 15, 13—41.
- 1954: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien IV. Vitalfärbung von *Achyla racemosa* mit den basischen Farbstoffen Neutralrot und Acridinorange. *Protoplasma* 44, 165.
- Kinzel, H., 1954: pH-Werte alkalischer Phosphatpufferlösungen. *Protoplasma* 43, 441—449.
- Kirchheimer, F., 1935: Protoplasma und Wundheilung bei *Phycomyces*. *Planta* 19, 574—606.
- Kuchar, K., 1950: Plasmolyseverhalten von *Oospora lactis*. *Sydowia, Ann. Mycologici, Ser. II*, 4, 53—65.
- Küster, E., 1926: Beiträge zur Kenntnis der Plasmolyse. *Protoplasma* 1, 73, 91.
- 1929: Pathologie der Pflanzenzelle I. Pathologie des Protoplasmas. *Protoplasma-monographien* 3, Berlin.
- 1956: Die Pflanzenzelle. 3. Aufl., Jena.
- Lange, J. E., 1940: *Flora Agaricina Danica*. Copenhagen: Recato A/S.
- Lenz, W., 1924: Protoplastastudien an *Saprolegnia*. *Bot. Arch.* 5, 435.
- Moser, M., 1955: Die Röhrlinge, Blätter- und Bauchpilze (*Agaricales* und *Gastromycetales*). In: *Kleine Kryptogamenflora* hg. v. Gams, II b. Stuttgart: Fischer.
- Raybaud, L., 1911: Influence du milieu sur les Mucorinées. *Ann. Fac. Sci. Marseille* 20, 1. Zit. bei Küster, 1956: Die Pflanzenzelle.
- Ricken, A., 1910: Die Blätterpilze (*Agaricales*) Deutschlands und der angrenzenden Länder, besonders Österreichs und der Schweiz. Leipzig: Weigel.
- Spek, J., 1940: Metachromasie und Vitalfärbung mit pH-Indikatoren. *Protoplasma* 34, 533.
- Steinberg, R. A., 1940: Action of some organic compounds on yield, sporulation and starch formation of *Aspergillus niger*. *J. Agric. Res.* 60, 765. Zit. bei Gutz, H., 1956: Zur Analyse der Granulafluorochromierung mit Nilblau in den Hyphen von *Mucor racemosus* Fres. *Planta* 46, 481—511.

- Strugger, S., 1940: Neues über Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma* 34, 601—608.
- 1941: Die Kultur von *Didymium nigripes* aus Myxamöben mit vitalgefärbtem Plasma und Zellkernen. *Z. Mikrosk.* 57, 415—419.
- 1945: Untersuchungen über vitale Fluorochromierung der Hefezellen. *Flora* 137, 73.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebsphysiologie der Pflanze, 2. Aufl., Berlin: Springer.
- Toth, A., 1951: Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht. *Protoplasma* 41, 103.
- Ulehla, Vl., und L. v. Moravek, 1922: Über die Wirkung von Säuren und Salzen auf *Basidiobolus ranarum*. *Ber. dtsch. bot. Ges.* 40, 8—40.
- Weber, F., 1924: Plasmolyseform und Plasmaviskosität. *Öst. bot. Z.* 73, 261.
- 1929 a: Plasmolyse-Ort. *Protoplasma* 7, 583.
- 1929 b: Plasmolyse-Zeit-Methode. *Protoplasma* 7, 622.
- 1930: Vakuolenkontraktion und Protoplasmaentmischung bei Blütenblattzellen. *Protoplasma* 10, 598.

Die lichtabhängige Vakuolisierung der Chloroplasten in Nikotinlösungen

I. Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Frage der Reversibilität

Von

Hildegard Lindner

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster/Westfalen

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Juli 1958)

I. Einleitung

Die Vakuolisierung der Chloroplasten bei Belichtung in Alkaloidlösung wurde erstmalig von Lärz (1942) beschrieben. Die Vakuolenbildung erklärte Lärz mit der verhinderten Diffusion des Assimilationszuckers durch die Plastidengrenzschicht infolge einer Abdichtung durch die Alkaloide, so daß eine osmotisch bedingte Aufblähung der Plastiden erfolgt. Lärz konnte ein Ansteigen des osmotischen Wertes der Vakuolen mit der Dauer der Belichtung feststellen. Bei einer Hemmung der Assimilation mit Phenylurethan, tiefen Temperaturen, Dunkelheit und Plasmolyse beobachtete er auch eine Hemmung der Vakuolisierung. Nach Bauer (1942) untersuchte auch Hanssen (1947) die Vakuolenbildung der Chloroplasten und stellte eine Reversibilität der Vakuolen in Leitungswasser und Dunkelheit fest. Schmidt (1951) konnte die Bildung von Zucker in den Belichtungs-vakuolen und den entstehenden Sauerstoff nachweisen. Schmidt sah in der lichtabhängigen Vakuolisierung der Chloroplasten in Alkaloidlösungen eine cytologische Methode zum Nachweis der Assimilation von Chloroplasten intakter Zellen. Mudrack (1956) dehnte diese experimentell-cytologischen Untersuchungen auf isolierte Chloroplasten aus und stellte fest, daß auch isolierte Plastiden bei Belichtung in Alkaloidlösungen Vakuolen ausbilden.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Lärz'schen Methode weitere Untersuchungen an Plastiden durchgeführt. Die cytologischen Befunde zur Plastidenvakuolisierung von Lärz im Jahre 1942 sollten an Hand der seitdem veröffentlichten Ergebnisse der Chloroplastenforschung noch-

mals geprüft und ergänzt werden. Es wurden die Reversibilität und Irreversibilität der Vakuolisierung untersucht. Neben Chloroplasten wurden auch Proplastiden, Jungchloroplasten und vergilbende Plastiden zu den Versuchen herangezogen.

II. Material und Technik

Als Versuchspflanze diente *Helodea densa*. Die Untersuchungen an Proplastiden wurden an Blattbasiszonen von $\frac{1}{4}$ bis 1 mm langen Blättchen aus Dunkelkulturen von *Helodea*-Knospen durchgeführt (vgl. Strugger 1937, Böing 1956). In der Blattspitze des gleichen Materials waren Jungchloroplasten zu beobachten.

Zu den Versuchen an ausdifferenzierten Chloroplasten wurden jeweils die Blattwirtel 5 cm unterhalb der Knospenregion unter normalen Kulturbedingungen gewachsener Sprosse verwendet. Bei der mikroskopischen Auswertung wurden nur die Zellen der Blattspreite in der Mittelregion eines jeden Blattes berücksichtigt. Auf diese Weise wurden vergleichbare Beobachtungen ermöglicht (Strugger 1935, Lilienstern 1935, Perner 1950). Die Zellen der Blattunterseite waren für die Untersuchungen an Chloroplasten geeigneter als die größeren und daher unübersichtlichen Zellen der Blattoberseite. Den etwaigen jahreszeitlich bedingten Schwankungen des Versuchsmaterials wurde durch mehrfache Wiederholung der Versuche im Laufe des Jahres Rechnung getragen (Gahlen 1954). Die Stadien der Plastidenreduktion wurden an altersvergilbten Sprossen von *Helodea densa* oder auch nach experimentell hervorgerufener Vergilbung durch mehrwöchige Dunkelkultur in stagnierendem Wasser untersucht.

Bei allen Versuchen wurde das Pflanzenmaterial in der Alkaloidlösung in Petrischalen schwimmend belichtet. Die Sprosse von *Helodea densa* wurden dazu mit einem Rasiermesser in Blattwirtel zerteilt, damit möglichst auf jedes Blatt die gleiche Lichtintensität einwirken konnte. Als Lichtquelle wurden Osramglühlampen (75 W, 150 W, 300 W) verwendet, die zur Ausschaltung der Wärmestrahlen in einem mit Leitungswasser durchflossenen Glasbehälter hingen (Lärz 1942, Schmidt 1951, Mudrack 1956). Die Lichtstärke betrug 12 000 Lux. Die Temperatur des Versuchssaumes wurde durchschnittlich auf 20°C gehalten, die Temperatur der Nikotinlösung war ebenfalls 20°C.

Alle lichtmikroskopischen Untersuchungen sind am lebenden, ungefärbten Material durchgeführt worden. Es wurde dazu das binokulare Forschungsmikroskop BST 29/79 von Leitz mit dem Objektiv 1/16 Fl Öl, num. Ap. 1, 32, 114 : 1 und den Periplanokularen 10× benutzt (Tubusfaktor: 1,6×). Als Lichtquelle fand die Monolafix-Niedervoltlampe von Leitz Verwendung. Die Mikroaufnahmen wurden mit einer Leica in Verbindung mit dem Mikroaufsatz „Mikas“ von Leitz (Faktor: 1/5) und dem Periplanokular 15× hergestellt. Als Aufnahmematerial dienten die Kleinbildfilme ADOX KB 14 und AGFA 13/10 DIN, die in Ultrafin 55 entwickelt wurden. Die Gesamtvergrößerung der photographierten Objekte beträgt 2280fach. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem Leitz-Ortholux mit Philips-Brenner CS 150 und 4 mm-Blaufilter und Okularsperrfilter OG 1 2,5 mm durchgeführt.

III. Vakuolisationsversuche an Plastiden verschiedener Entwicklungsstadien

1. Proplastiden nach Belichtung in Nikotinlösung

Das Versuchsmaterial wurde nach der eingangs beschriebenen Methode vorbereitet (Strugger 1957, Böing 1956). Nach durchschnittlich dreiwöchiger Dunkelkultur wurden die 0,7 bis 1 mm langen Blättchen aus der Knospenregion mit einem Stück Stengelgewebe abgeschnitten, um das Abkugeln der Plastiden und sonstige Schädigungen der Blattbasiszellen zu verhindern. Die Plastiden der Blattbasiszellen waren amöboid, etwa $1,8\mu$ lang und $0,8\mu$ breit. In diesen uni- bis bigranulären Proplastiden waren die Primärgrana auch im ungefärbten Lebendpräparat zu erkennen (Abb. 2a). Wie fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Strugger (1954) zeigten, führen schon die Grana der Proplastiden in den Blattmeristemen Chlorophyll.

Böing (1953) konnte auch in den etioliierten Plastiden von *Helodea* nach 3 Stunden Belichtung mit diffusen Tageslicht fluoreszenzmikroskopisch die chlorophyllführenden Primärgrana nachweisen. Eigene fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden an 0,2 mm langen Blättchen aus der Knospenregion von *Helodea densa* durchgeführt. In allen Zellen dieser Blättchen, von der Blattbasis bis zur Blattspitze, war Rotfluoreszenz nachzuweisen. In den Proplastiden der Blattbasiszellen war ein scheibenförmiger, rot fluoreszierender Körper zu beobachten.

Vorversuche ergaben, daß die Vakuolisierung der Proplastiden durch Belichtung in Nikotinlösung eindeutig zu trennen war von der mehrfach beschriebenen, normalen Vakuolenbildung im Stroma der Proplastiden (Strugger 1954, Strugger und Losada-Villasante 1956). Diese Vakuolen unbehandelter Proplastiden traten keineswegs lichtabhängig auf und beeinträchtigten nicht völlig die Amöboidie der Proplastiden. Die experimentell hervorgerufenen Vakuolen wuchsen dagegen bei fortdauernder Belichtung ständig an und dehnten das amöboide Proplastid bis zu einem kugeligen Körper aus, dessen Gesamtdurchmesser den des ursprünglichen amöboiden Plastids bei weitem überstieg (Abb. 2c).

Um die Vakuolisierbarkeit der Proplastiden bei Belichtung in Nikotinlösung 1 : 2000 bei 12 000 Lux annähernd quantitativ zu ermitteln, wurde nach jeder Stunde Belichtung der Durchmesser der vakuolisierten Proplastiden in den Blattbasiszellen ausgemessen. Jeder der in Abb. 1 angegebenen Werte ist der Mittelwert aus 10 einzelnen Belichtungsversuchen,

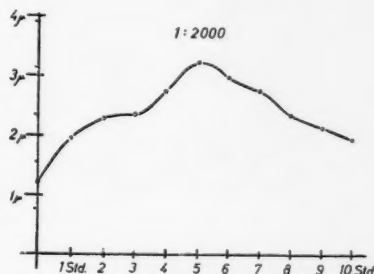


Abb. 1. Größenänderung vakuolierter Proplastiden in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer. Abszisse: Belichtungszeit in Stunden (12 000 Lux). Ordinate: Mittelwerte der Größemessungen vakuolierter Proplastiden, Durchmesser in Mikron.

bei welchen jedesmal in 20 verschiedenen Blattbasiszellen der Durchmesser des größten in einer Zelle beobachteten Proplastids ausgemessen wurde. Diese Werte sind innerhalb der üblichen Fehlergrenzen physiologischer Versuche bedingt gültig. Bei jedem Versuch war nach 5 Stunden Belichtung der Durchmesser der in Nikotinlösung vakuolisierten Plastiden am größten. Darauf folgte ein stetiges Absinken der Gesamtgröße der vakuolisierten Proplastiden. Die Abb. 2 a, b, c zeigen Proplastiden während der Größenzunahme bei Belichtung in Nikotinlösung. Die in Abb. 2 a dargestellten

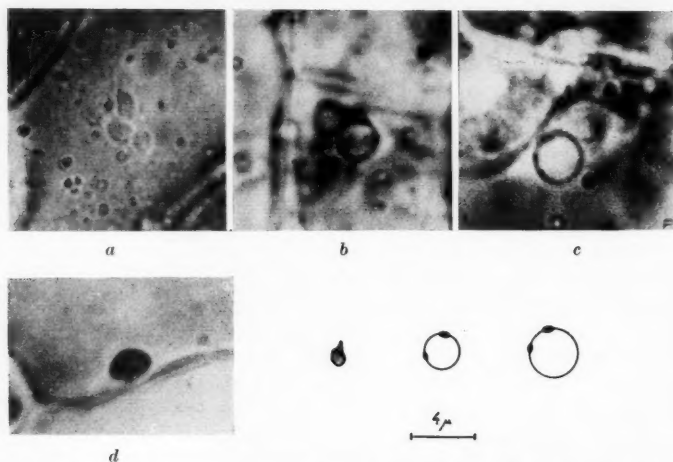


Abb. 2. a Proplastiden vor Versuchsbeginn. Ungefärbtes Lebendpräparat. b Vakuolisierte Proplastiden nach 3 Std., c nach 5 Std. Belichtung in Nikotinlösung 1 : 2000. d Ehemals vakuolisiertes Proplastid. Nach 10 Tagen Leitungswasser normal weiterentwickelt zum Jungchloroplasten.

Proplastiden aus unbelichteten Kontrollen wurden ebenfalls ungefärbt und lebend mikrophotographiert. Sie erschienen im Lichtmikroskop etwas dunkler getönt als das Cytoplasma, und sie waren stets deutlich vom umgebenden Plasma abgesondert. Auch bei der Lebenduntersuchung war in den Proplastiden ein scheibchenförmiger Einschlusskörper von den Dimensionen des Primärgranums zu beobachten, der sich nicht als Stärke identifizieren ließ. Bei den vakuolisierten Proplastiden waren die scheibchenförmigen Grana deutlich erkennbar (Abb. 2 b, 2 c). Das Innere der Vakuole war glasklar durchsichtig.

2. Jungchloroplasten nach Belichtung in Nikotinlösung

Um die Jungchloroplasten nach der Belichtung bei 12 000 Lux in Nikotinlösung 1 : 2000 lichtmikroskopisch zu untersuchen, wurden die Zellen der Blattspitze etwa 1 mm langer Blättchen von *Helodea densa* ausgewählt. Diese multigranulären, nicht mehr amöboiden Jungchloroplasten

vakuolisierten auch bei Belichtung in Nikotinlösung und zeigten ebenfalls eine Zunahme des Durchmessers bei mehrstündiger Belichtung. Mit zunehmender Vakuolisierung nach zwei- und mehrstündiger Belichtung wurde auch der Feinbau der Plastiden genauer unterscheidbar. Im Zuge der

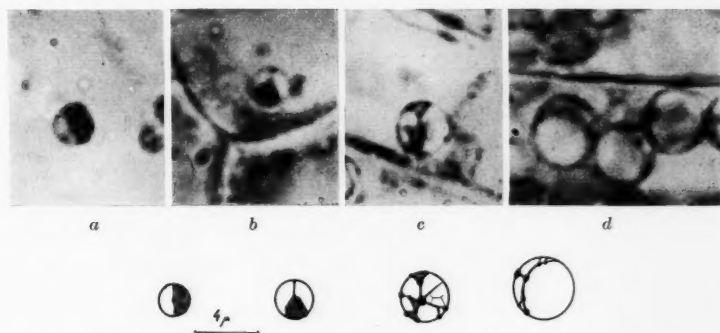


Abb. 3. Vakuolisierte Jungchloroplasten nach 1 bis 5 Std. Belichtung in Nikotinlösung 1 : 2000. Ungefärbt, lebend. *c* und *d* Lokalisation der Grana auf Trägerlamellen deutlich.

Vakuolisierung dieser Jungchloroplasten konnte deutlich eine Lokalisation der Grana auf Trägerlamellensystemen festgestellt werden (Abb. 3). Nach-

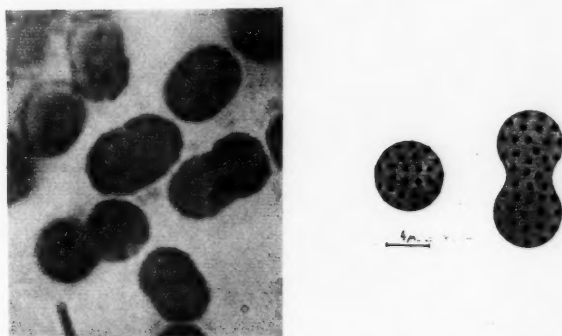


Abb. 4. Plastiden aus Farnprothallien. Unbelichtete Kontrollen.

träglich konnte an Hand der Vakuolisationserscheinungen bei vollentwickelten Chloroplasten vermutet werden, daß bei dem vakuolisierten Jungchloroplasten in Abb. 3 b schon möglicherweise auf die Anwesenheit eines Peristromiums zwischen Gelkörper und Grenzschicht des Plastids zu schließen wäre. Das Phänomen dieser im Zuge der Vakuolisierung sichtbar werdenden Peristromiumfäden — etwa den Hechtschen Fäden bei der Plasmolyse der Zellen vergleichbar — wird bei der Besprechung der

Vakuolenbildung des vollentwickelten Chloroplasten nochmals erörtert werden.

Für die Untersuchungen der lichtabhängigen Vakuolisierung von Plastiden in der Teilungsphase erwiesen sich Farnprothallien als besonders geeignet, da hier die Plastidengröße 6 bis 15 μ beträgt und sich in einer Zelle stets mehrere Plasti-



Abb. 5. *a* Ovale Plastid ohne seitliche Einschnürung zeigt bei Vakuolisierung auch schon die Trennung in zwei Gelkörper. *b* und *c* hantelförmige Teilungsstadien, vakuolisiert. Die zwei schon getrennten Gelkörper werden noch von einer Membran umspannt.

den dieses Stadiums befinden. Abb. 4 zeigt verschiedene Stadien vom Plastid mit 6,5 μ Durchmesser bis zum doppelt so großen, hantelförmigen Plastid von 13 μ Länge, welches schon aus zwei selbständigen Plastidengelkörpern zu bestehen scheint. In Abb. 4 ist unten links ein Plastid zu erkennen, welches in der Mitte die auch von Fasse-Franzisket (1956) für fortgeschrittene Teilungsstadien

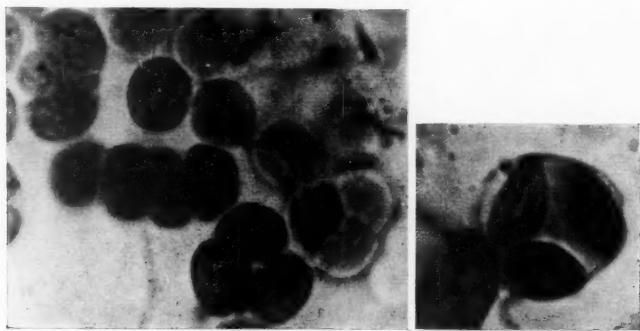


Abb. 6. Anomale Teilungsstadien nach 4 und 6 Std. Belichtung in Nikotinlösung 1:2000. Durch die Vakuolisierung wird die Anzahl der Gelkörper und die Lage der Granaschichten deutlich.

beschriebene, farblose Zwischenzone aufweist (Literatur bei Fasse-Franzisket 1956). Um das Eindringen der Nikotinlösung trotz der starken Kutikula zu ermöglichen, wurden die etwa 0,5 bis 1 mm² großen Prothallien mit der Rasierklinge in kleinere Stücke zerteilt und 1 bis 2 Stunden im Dunkeln in die Nikotinlösung 1:2000 gelegt. Die Zellen der Schnittländer wurden bei der Auswertung der Versuche nicht berücksichtigt, da sie offenbar geschädigt waren, wie das Streifwerden der Plastiden, das Aussetzen der Plasmaströmung und das Auftreten der

Brown'schen Molekularbewegung zeigten. Nach 5 Stunden Belichtung mit 12 000 Lux trat die Vakuolisierung bei den Chloroplasten der ungeschädigten Zellen ein. Die vorher hantelförmigen, $13\ \mu$ langen Plastiden, die in der Mittelzone eine leichte, seitliche Einschnürung aufwiesen, trennten sich bei der Vakuolisierung deutlich in zwei Gelkörper, die aber noch von einer gemeinsamen Grenzsicht umschlossen wurden (Abb. 5 b, 5 c). Die 7 bis $8\ \mu$ langen, ovalen Plastiden, welche vor der Belichtung noch keine seitliche Einschnürung besaßen, zeigten jedoch bei der Vakuolisierung auch schon die Trennung in zwei Gelkörper (Abb. 5 a). Durch die Vakuolisierung wurde auch bei anomalen Teilungsstadien die Anzahl der entstehenden Plastiden und die Anordnung der Granaschichten deutlicher sichtbar (Abb. 6).

3. Vollentwickelte Chloroplasten nach Belichtung in Nikotinlösung

Die Beschreibung der Vakuolisierungserscheinungen der Chloroplasten nach Belichtung in Nikotinlösung von Lärz (1942) sollte an Hand der seitdem veröffentlichten Ergebnisse der Plastidenforschung nochmals eingehend morphologisch geprüft werden. Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der in fünf verschiedenen Nikotinkonzentrationen von 1:1000 bis 1:5000 bei 12 000 Lux belichteten *Helodea*-Blätter war eine stündlich wechselnde Formmannigfaltigkeit der vakuolisierten Chloroplasten in den Zellen zu beobachten. Um nun bei der Vakuolisierung etwaige Gesetzmäßigkeiten feststellen zu können, wurden Größenmessungen

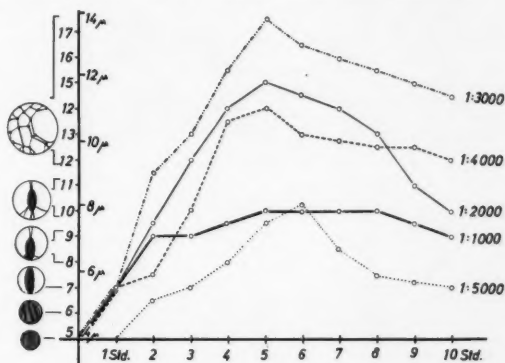


Abb. 7. Größenänderungen der vakuolisierten Chloroplasten in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer und der Nikotinkonzentration. Abszisse: Belichtungsdauer in Stunden (12 000 Lux). Ordinate: Durchmesser des größten beobachteten vakuolisierten Chloroplasten pro *Helodea*-Blatt, angegeben in Mikron.

vorgenommen. Da auch innerhalb ein und derselben Zelle die verschiedenartigsten Vakuolisierungstypen anzutreffen waren, wurde jeweils der Durchmesser des größten beobachtbaren vakuolisierten Chloroplasten einer Zelle ausgemessen. Abb. 7 zeigt die Mittelwerte dieser Größenmessungen, die für jede der Nikotinkonzentrationen 1:1000 bis 1:5000 nach jeder Stunde Belichtung an 20 verschiedenen Zellen ermittelt wurden. Für alle fünf angewandten Nikotinkonzentrationen wurden diese Belichtungsversuche zehnmal wiederholt. Der Durchmesser des größten vakuolisierten Chloroplasten einer Zelle hatte in allen Nikotinkonzentrationen nach 5 Stunden Belichtung den Höchstwert erreicht. Weitere Belichtung hatte wie bei den Versuchen mit Proplastiden auch hier ein Absinken des Durchmessers der größten

vakuolisierten Chloroplasten pro Zelle zur Folge. Mit der Größenänderung war nun aber auch deutlich ein kontinuierlicher Wandel der Vakuolisations-typen zu bemerken. Es wurde in Abb. 8 versucht, die charakteristischen Stadien des Vakuolisationsablaufes darzustellen. Der Übersichtlichkeit halber ist die Mannigfaltigkeit der Bilder auf ein Minimum reduziert worden, obwohl selbstverständlich keines der angegebenen Vakuolisations-bilder abrupt ohne Übergangsstadium auf das vorhergehende folgte.

Zu Beginn der Vakuolisierung war die Abhebung der Chloroplastengrenzschicht vom linsenförmigen Gelkörper nur in Profilstellung sichtbar.

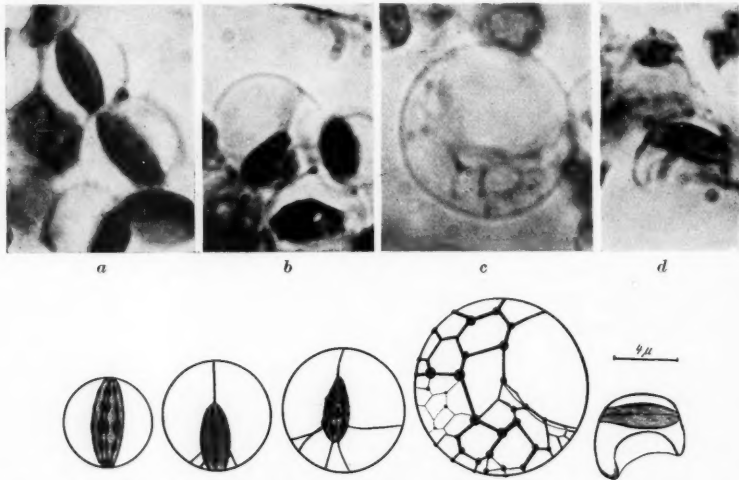


Abb. 8. Fünf typische Vakuolisationsstadien des Chloroplasten. *a* Durchmesser $5,5 \mu$, *b* $6,2$ bis $8,8 \mu$, *c* 9 bis 14μ . Geplatzte Chloroplastenmembran infolge Überdehnung bei der Vakuolisierung.

Bei einem Durchmesser von $5,5 \mu$ nahm der vakuolisierte Chloroplast regelmäßig Kugelgestalt an. Der Gelkörper behielt seine Linsenform bei und war nur noch anscheinend polar an der Chloroplastenmembran angeheftet (Abb. 8 *a*). Mit zunehmender Größe des vakuolisierten Chloroplasten hob sich jedoch allmählich die Grenzschicht auch von diesen Ansatzstellen des Gelkörpers ab. Nun wurde als Verbindung zwischen Grenzschicht und Gelkörper eine fädig ausgezogene Substanz lichtmikroskopisch sichtbar, welche auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen als Peristromium gedeutet wurde (vgl. II. Teil vorliegender Arbeit). Bei diesem Vakuolisationsstadium war der Gelkörper also nur noch durch peristromiale Substanz fädig mit der Grenzschicht verbunden (Abb. 8 *b*). Bei einem Durchmesser des vakuolisierten Chloroplasten von 8μ betrug der Durchmesser des Chloroplastengelkörpers noch immer 4μ wie der des nicht vakuolisierten Plastids. Die Grana waren hier wie in allen vorhergehenden Stadien deutlich zu erkennen. Oft war die geldrollenartige Anordnung der Grana

zu beobachten, wie auch Abb. 8a zeigt. Erreichten die vakuolisierten Chloroplasten einen Durchmesser von 9μ und mehr, so war in keinem Falle mehr der linsenförmige, durch peristromiale Substanz fädig mit der Grenzschrift verbundene Gelkörper zu sehen. An Stelle des Gelkörpers war der Chloroplast erfüllt von einem Netzwerk regelmäßig angeordneter „Fäden“, die an den Verknüpfungspunkten granagroße „Kugeln“ aufwiesen (Abb. 8c). Dieses „Netzwerk“ war bei den 11 bis 14μ großen vakuolisierten Chloroplasten nicht mehr gleichmäßig im ganzen Chloroplasten verteilt, sondern lag nur noch sichelförmig in einer Hemisphäre des vakuolisierten Plastids. Abb. 8c zeigt den Beginn dieser letzten Vakuolisationsphase. Die Grenzschrift hielt offenbar einer weiteren Ausdehnung nicht stand, denn nach dem Auftreten von 11 bis 14μ großen vakuolisierten Chloroplasten waren in vielen Zellen Plastiden mit geplatzter Grenzschrift zu beobachten, wie Abb. 8d veranschaulicht. Nach dem Zerreißen der Grenzschrift hatte der Chloroplast wieder seine ursprüngliche Größe angenommen, und der Gelkörper des Chloroplasten trat plötzlich wieder kompakt und linsenförmig in Erscheinung. Das „Netzwerk“ in den 9 bis 14μ großen vakuolisierten Chloroplasten dürfte demnach aller Wahrscheinlichkeit nach mit dem allseitig gedehnten Lamellensystem des Chloroplastengelkörpers identisch sein.

4. Vergilbte Plastiden nach Belichtung in Nikotinlösung

Die vergilbten Blätter aus dreiwöchigen Dunkelkulturen ausgewachsener *Helodea*-Sprosse zeigten einen deutlichen Gradienten der Plastidenreduktion von der Basis zur Spitze. Die Zellen der Blattbasis wiesen Chloroplasten mit einem Durchmesser von 4μ auf. Die Grana waren in der normalen Größe und Lage sichtbar. Die gelblichgrünen Plastiden der Blattmitte hatten einen Durchmesser von 2 bis 4μ und ließen in der Flächenansicht

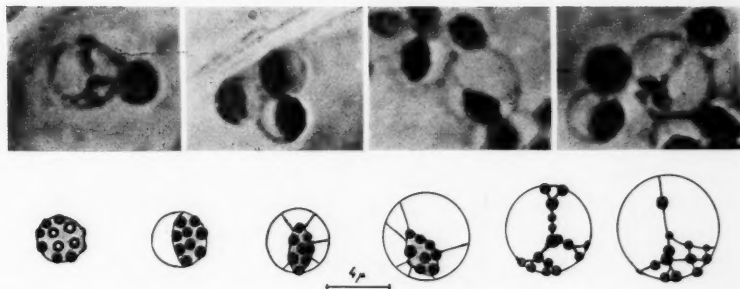


Abb. 9. Plastiden zu Beginn der Vergilbung, nach 1 bis 5 Std. Belichtung in Nikotinlösung 1 : 2000 vakuolisiert.

stark lichtbrechende Kugeln erkennen, 10 bis 15 an der Zahl und anscheinend größer als die Grana der Chloroplasten (Abb. 9). Die gelben, $1,8\mu$

bis $2,5\ \mu$ großen Plastiden der Blattspitze schienen nur noch aus durchschnittlich 2 bis 7 dieser kugeligen Körperchen aufgebaut zu sein (Abb. 10).

Die gelbgrünen, im Anfangsstadium der Reduktion stehenden Plastiden der Blattmitte vakuolisierten bei Belichtung in Nikotinlösung 1:2000 in derselben Reihenfolge wie die ausdifferenzierten Chloroplasten. Die Grenzsicht hob sich allmählich vom Gelkörper ab und war bei fortschreitender Größenzunahme des vakuolisierten Chloroplasten nur noch durch fadenziehende, peristromiale Substanz mit dem Gelkörper verbunden (Abb. 9). Im nächstfolgenden Vakuolisationsstadium war statt des kompakten Gelkörpers ein „Netzwerk“ mit kugelartigen, stark lichtbrechenden Körpern zu sehen (Abb. 9 a und 9 d).

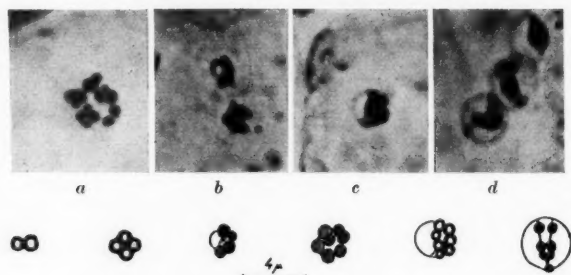


Abb. 10. Vakuolisierte vergilbte Plastiden, fortgeschrittene Vergilbungsstadien. a und b extrem vergilbte Plastiden.

Die gelben, extrem degenerierten Plastiden der Blattspitze mit einem Durchmesser von $1,8$ bis $2,5\ \mu$ zeigten dagegen nach 3 Stunden Belichtung mit $12\ 000$ Lux in Nikotinlösung 1:2000 noch keine Vakuolen. Nach mehr als 5 Stunden Belichtung waren erst 1 bis 2 Plastiden pro Zelle deutlich vakuolisiert. Die in Abb. 10 d gezeigten Stadien entsprechen möglicherweise den Vakuolen mit netzig gedehntem Gelkörper, die in der letzten Phase der Vakuolisierung des vollentwickelten Chloroplasten auftraten. Das Netzwerk ist hier allerdings auf wenige Fäden mit 5 bis 7 „kugelartigen Körperchen“ reduziert, entsprechend der Lamellenreduktion bei vergilbten Plastiden. Dieser Vakuolisierungstyp war jedoch niemals bei den Plastiden zu entdecken, die nur noch 2 bis 4 „kugelige Körperchen“ erkennen ließen (Abb. 10 a). Offenbar waren hier die Lamellensysteme schon endgültig reduziert.

IV. Reversibilität der Vakuolenbildung

Nach jeder Stunde Belichtung in Nikotinlösung 1:2000 wurden die Blätter von *Helodea densa* gesondert in Gefäße mit Leitungswasser übertragen und in der Dunkelheit oder bei diffusum Tageslicht von maximal 200 Lux aufgestellt. Wie Vorversuchsreihen ergaben, hatte diese Lichtintensität keinerlei Einfluß auf die etwaige Reversibilität der Vakuolen. Danach

wurde täglich eine lichtmikroskopische Prüfung dieses Blattmaterials vorgenommen. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob und wie weit die Vakuolisierung der Plastiden reversibel war.

Für die Proplastiden von *Helodea densa* konnte bei der Prüfung der Reversibilität der Vakuolen folgendes festgestellt werden: Die bis zu 4 Stunden belichteten, vakuolisierten Proplastiden nahmen im Leitungswasser allmählich wieder ihre ursprüngliche Größe an und zeigten nach etwa 5 Tagen Aufenthalt in Leitungswasser keine Vakuolen mehr. Wie die Proplastiden der nicht vakuolisierten Kontrollen wuchsen diese zu formkonstanten, multigranulären Jungchloroplasten heran (Abb. 2 d). Im Vergleich zu den äußerst kontrastarmen Proplastiden wiesen diese Jungchloroplasten schon eine intensiv grüne Färbung auf (vgl. Abb. 2 a und 2 d). Diese Plastiden waren abermals vakuolisationsfähig, wie eine Wiederholung der Belichtungsversuche in Nikotinlösung 1:2000 zeigte. Die mehr als 5 Stunden in Nikotinlösung belichteten Proplastiden waren jedoch irreversibel geschädigt, zeigten keinen Rückgang der Vakuolen und entwickelten sich nicht zu Jungchloroplasten weiter.

Bei den Jungchloroplasten waren die Vakuolen bis auf einen geringen Prozentsatz bei den 3 bis 4 Stunden belichteten Plastiden vollständig reversibel. Die Weiterentwicklung der Jungchloroplasten dieses Blattmaterials zu Chloroplasten war nicht sistiert. 5 Stunden Belichtungsdauer war hier das Maximum für nicht irreversibel schädigende Vakuolisierung. Die länger als 5 Stunden belichteten, vakuolisierten Jungchloroplasten zeigten bei Behandlung mit Leitungswasser keinen Rückgang der Vakuolen und entwickelten sich nicht weiter zu Chloroplasten. Diese länger als 5 Stunden in Nikotinlösung belichteten Blättchen waren nach etwa 14 Tagen Aufenthalt in Leitungswasser völlig turgeszenzlos. Alle Zellen waren abgestorben.

Die Reversibilität der Vakuolenbildung bei vollentwickelten Chloroplasten wurde eingehender untersucht. Hierzu mußte zunächst eine annähernd quantitative Bestimmung der verschiedenen Vakuolisationsstadien erfolgen, da innerhalb einer und derselben Zelle je nach der Nikotinkonzentration und der Belichtungsdauer die Formenmannigfaltigkeit der Vakuolisierung wechselte. Erst dann konnte die Reversibilität der verschiedenen Vakuolisierungstypen in Leitungswasser genauer bestimmt werden. Für jede der 5 Nikotinkonzentrationen von 1:1000 bis 1:5000 wurden in jeweils zehn verschiedenen Zellen der Blattmitte nach jeder Stunde Belichtung mit 12 000 Lux die sechs verschiedenen Vakuolisationsstadien ausgezählt, welche in Kap. III, 3 durch Größenmessungen an vakuolisierten Plastiden ermittelt wurden. Jeder dieser Belichtungsversuche wurde mindestens fünfmal wiederholt, so daß jeder der in der Abb. 12 angegebenen Werte der Mittelwert aus mindestens 50 verschiedenen Auszählungsergebnissen ist. Die statistische Sicherheit war hierbei größer als 99%. Die sechs berücksichtigten Vakuolisationsstadien (Abb. 11) wurden in Prozent der Gesamtzahl der Chloroplasten einer Zelle angegeben. Bei allen verwendeten Nikotinkonzentrationen stiegen die Anzahl der vakuolisierten Plastiden und die Vakuolengröße bis zu 5 Stunden Belichtung kontinuierlich an, sanken

dann wieder und erreichten meistens bei 9 Stunden Belichtung ein zweites, aber geringer ausgeprägtes Maximum. Dieses wird besonders bei der Kurve des Vakuolisierungsstadiums V deutlich, welches die größten vakuolisierten Chloroplasten darstellt. In der Konzentration 1 : 5000 waren gar keine dieser 9 bis 14 μ großen Chloroplasten mit netzig gedehntem Gelkörper zu beobachten, und dementsprechend waren selbst nach 24 Stunden Belichtung noch keine Chloroplasten mit geplatzter Grenzschrift (Stadium VI) festzustellen. Die Maxima des Vakuolisierungsstadiums IV lagen hier jedoch auch bei 5 und 9 Stunden Belichtung.

Nach dieser statistischen Ermittlung der verschiedenen Vakuolentypen wurde die Reversibilität der Vakuolen in Leitungswasser untersucht. Auch

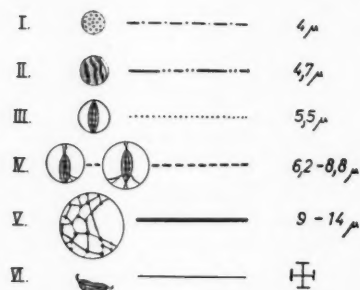
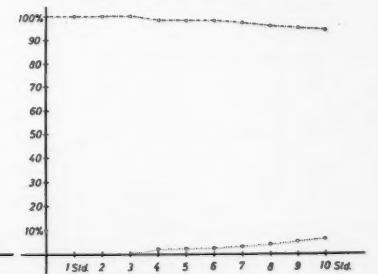
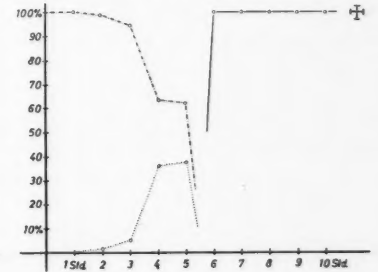
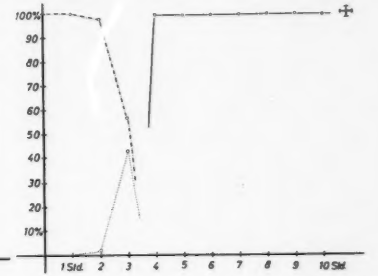
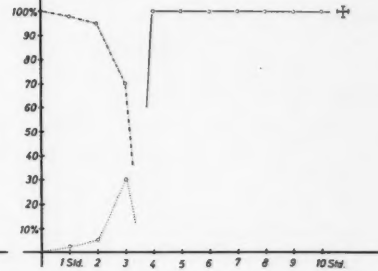
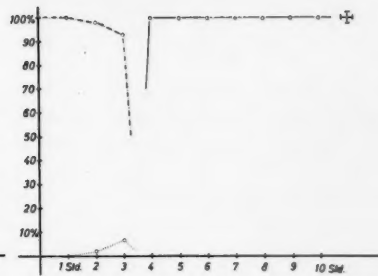


Abb. 11. Die sechs typischen Stadien der Vakuolisierung des Chloroplasten, welche bei den Auszählungen in Abb. 12 berücksichtigt wurden.

hier wurden nach jeder Stunde Belichtung mit 12000 Lux die Blattwirtel von *Helodea densa* aus den 4 Nikotinkonzentrationen gesondert in Gefäße mit Leitungswasser übertragen und bei Dunkelheit oder diffusum Tageslicht von maximal 200 Lux aufgestellt. Jeden Tag wurden die Blätter einer lichtmikroskopischen Prüfung unterzogen. Die Abb. 12 b zeigt die nach 10 Tagen Aufenthalt in Leitungswasser ermittelten Auszählungsergebnisse der sechs Vakuolisierungsstadien. Ein Vergleich mit den Kurven der entsprechenden Belichtungsversuche (Abb. 12 a) zeigt die Reversibilität der Vakuolen und gleichzeitig auch das Ausmaß der irreversiblen Schädigung

der Chloroplasten. 100%ige Reversibilität der Vakuolen bis zur normalen Chloroplastenstruktur lag nach 1 Stunde Belichtung in allen fünf angewandten Nikotinkonzentrationen außer 1 : 2000 vor. In den zwei und mehr Stunden belichteten Blättern konnten zwar nach 10 Tagen Leitungswasser noch einige vakuolisierte Chloroplasten beobachtet werden (Näheres s. Abb. 12 b). Aber diese vakuolisierten Chloroplasten maßen jedoch ausschließlich nur noch 5,5 μ . In keinem Falle wurden nach 10 Tagen Leitungswasser vakuoli-

Abb. 12. Auszählungsergebnisse der verschiedenen Vakuolisierungsstadien des Chloroplasten (Abb. 11) nach 1 bis 10 Std. Belichtung in Nikotinlösung 1 : 1000 bis 1 : 5000 bei 12 000 Lux. Abszisse: Belichtungsdauer in Stunden. Ordinate: Prozentualer Anteil der sechs Vakuolisierungsstadien (Abb. 11) an der Gesamtzahl der Plastiden einer *Helodea*-Zelle. b Reversibilität der Vakuolisierungsstadien der jeweiligen nebenstehenden Belichtungsversuche, nach 10 Tagen Leitungswasser ermittelt. Abszisse: Dauer der Belichtung vor der Übertragung des Blattmaterials aus Nikotinlösung in Leitungswasser. Ordinate: Prozentualer Anteil der sechs Vakuolisierungsstadien (Abb. 11) an der Gesamtzahl der Plastiden einer *Helodea*-Zelle nach 10 Tagen Aufenthalt in Leitungswasser.



sierte Chloroplasten beobachtet, welche über $5,5 \mu$ Durchmesser hatten. Demnach waren also die Vakuolisationsstadien IV bis V bis zu diesem $5,5 \mu$ großen Vakuolisationsstadium III reversibel. Auch die über 9μ großen, vakuolierten Plastiden (Stadium V) waren also bis zu $5,5 \mu$ zurückgegangen, und sie stellten folglich keine letalen Veränderungen dar. Nicht mehr intravital verlief der Aufenthalt des Blattmaterials in Leitungswasser, wenn nach vier- oder mehrstündiger Belichtung geplatzte Chloroplasten in den Zellen beobachtet worden waren (Stadium VI). Nach 10 Tagen Aufenthalt in Leitungswasser wiesen die Plastiden dieses Blattmaterials keine Granastruktur mehr auf und waren deformiert und in Klumpen zusammengeballt. Die Zellen waren nicht mehr plasmolysierbar und zeigten in keinem Falle mehr Plasmaströmung.

Die Wiederbelichtung der Blätter von *Helodea densa* in Nikotinlösungen fünf verschiedener Konzentrationen von 1 : 1000 bis 1 : 5000 bei 12 000 Lux nach 10 Tagen Aufenthalt der Blätter in Leitungswasser ermöglichte es jedoch erst, eine scharfe Trennung zwischen der Reversibilität der Vakuolen und der Vitalität der Chloroplasten vorzunehmen. Es ergab sich, daß nur die je 2 Stunden in den Nikotinkonzentrationen 1 : 1000 bis 1 : 3000 und 4 Stunden in 1 : 4000 belichteten Chloroplasten nach 10 Tagen Aufenthalt in Leitungswasser bei der Wiederbelichtung noch den gleichen Grad der Vakuolisationsfähigkeit besaßen. Für die 3 Stunden in 1 : 1000 bis 1 : 3000 und 5 Stunden in 1 : 4000 belichteten Chloroplasten war wohl eine Reversibilität der Vakuolen festgestellt worden, und die Blätter zeigten keinerlei Absterbeerscheinungen. Aber das Ausbleiben größerer Vakuolen (Stadium IV) bei den Wiederbelichtungsversuchen deutete doch auf eine gewisse Funktionsbeeinträchtigung zumindest der Chloroplasten hin. Bei der Nikotinkonzentration 1 : 5000 waren die bis zu 10 Stunden belichteten Chloroplasten zum zweiten Male genau so vakuolisationsfähig wie bei der ersten Belichtung vor 10 Tagen. Für diese Konzentration von 1 : 5000 war also eine Reversibilität der Vakuolen und gleichzeitig auch eine Erhaltung der Funktionsfähigkeit der Chloroplasten festzustellen.

Für die noch nicht extrem vergilbten Plastiden der Blattmitte konnte bei der Prüfung der Reversibilität der Vakuolen in Leitungswasser folgendes festgestellt werden: Die Vakuolisierung der bis zu 3 Stunden in Nikotinlösung 1 : 2000 belichteten Plastiden von etwa 2 bis 4μ Durchmesser erwies sich als reversibel, wie die tägliche lichtmikroskopische Prüfung des nach jeder Stunde Belichtung in Leitungswasser übertragenen Blattmaterials ergab. Die fortschreitende Vergilbung der Plastiden war in keiner Weise durch die Vakuolisierung aufgehoben oder etwa rückgängig gemacht worden. Längere Belichtung als 3 Stunden hatte jedoch irreversible Schädigung des Blattmaterials zur Folge. Nach 1 bis 10 Tagen Aufenthalt in Leitungswasser starben die Zellen allmählich ab, wie am Aussetzen der Plasmaströmung und Auftreten der Brownschen Molekularbewegung zu erkennen war. Die Plastiden waren bei einer Wiederholung der Belichtungsversuche nicht weiter vakuolisierbar. Nach 10tägigem Aufenthalt in Leitungswasser zerfiel das Gewebe dieser mehr als 3 Stunden in Nikotinlösung 1 : 2000 belichteten, vergilbten Blätter.

V. Vakuolisierung der durch Rhodamin B hervorgerufenen „Näpfchenplastiden“

Wie eigene Untersuchungen zeigten, entstanden nach Lagerung von *Helodea*-Blättern in Lösungen von Rhodamin B 1 : 1000 in Leitungswasser „Näpfchen“-Plastiden. Diese „Näpfchen“-Plastiden traten sowohl nach Aufenthalt in Rhodamin B 1 : 1000 in diffusem Tageslicht als auch im Dunkeln auf. „Näpfchen“-plastiden waren von Schmidt (1951) bei Kulturversuchen mit Pyrederivaten und quartären Phosphoniumverbindungen beobachtet worden. Schmidt hatte Rhodamin B lediglich in einer Konzentration von 1 : 1 000 000 auf die Chloroplasten einwirken lassen und hierbei nur eine Streifung der Plastiden beobachten können. Eigene Untersuchungen er-

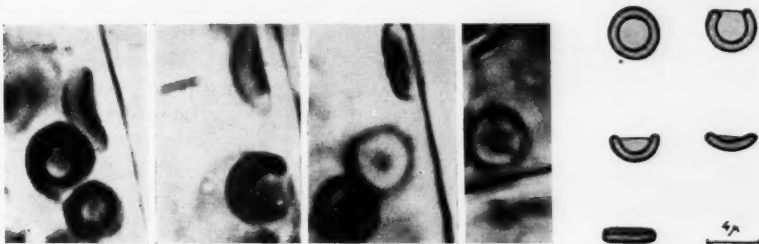


Abb. 13. „Näpfchen“-Plastiden nach 5 bis 20 Std. Aufenthalt in Rhodamin B 1 : 1000 in Leitungswasser.

gaben, daß in stärker verdünnten Lösungen als 1 : 1000 nur die von Schmidt für Rhodamin B beschriebene Streifung der Chloroplasten eintrat. In der Konzentration 1 : 1000 waren aber die Plastiden nur nach den ersten 3 bis 5 Stunden gestreift. Schon nach 5 Stunden war die Streifung der Chloroplasten verschwunden, und alle Plastiden wiesen statt dessen eine „Näpfchenform“ auf. Diese Näpfchenplastiden traten sowohl nach Aufenthalt in Rhodamin B 1 : 1000 im Dunkeln als auch bei Tageslicht oder höheren Lichtintensitäten (18 000 Lux) in Erscheinung. Abb. 13 zeigt derartig gestaltsveränderte Chloroplasten. In der Flächenansicht unterschied sich die ringartige Randzone von der heller roten Mittelzone durch intensivere Färbung. In leicht gekippter Stellung des Plastids erwies sich die Randzone außerdem wulstartig verdickt gegenüber dem helleren Innenteil. Die linsenförmig gewölbte Gestalt war in keinem Falle mehr zu sehen, und auch die Granastruktur war maskiert. Nach etwa 20 Stunden Aufenthalt in Rhodamin B 1 : 1000 in diffusem Tageslicht oder auch im Dunkeln nahmen die bis dahin in der Flächenansicht runden „Näpfchen“ eine eckige Form an (Abb. 14).

Alle Gestaltsveränderungen der Plastiden, die bis zu 24stündigem Aufenthalt in Rhodamin B 1 : 1000 auftraten, waren in Leitungswasser in diffusem Tageslicht reversibel. Die Streifung der Plastiden als das Initialstadium der Gestaltsveränderungen und auch die darauffolgenden „Näpfchen“-Plastiden verschwanden nach Aufenthalt in Leitungswasser all-

mählich wieder. In den Zellen waren dann wieder linsenförmige Chloroplasten zu beobachten. Nach 1 Tag Aufenthalt in Leitungswasser im Dunkeln oder in diffusem Tageslicht war der Farbstoff aus den auch makroskopisch dunkelrot erscheinenden Blättern allmählich ausgewaschen. Nur 1 bis 2 Plastiden pro Zelle hatten trotz der wiedereingetretenen Grünfärbung noch die „Näpfchenform“ beibehalten. Nach fortdauerndem Aufenthalt in Leitungswasser waren nur noch linsenförmige Chloroplasten mit sichtbaren Grana zu beobachten.

Vakuolisationsversuche an „Näpfchen“-Plastiden wurden an *Helodea*-Blättern durchgeführt, welche 10 Stunden in Rhodamin B 1:1000 gelegen

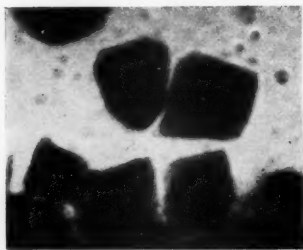


Abb. 14. Eckige „Näpfchen“-Plastiden nach mehr als 20 Std. Aufenthalt in Rhodamin B 1:1000 in Leitungswasser.

hatten und in deren Zellen ausschließlich „Näpfchen“-Plastiden festgestellt worden waren. Dieses Blattmaterial wurde in Rhodamin B 1:1000 in Leitungswasser mit Nikotinzusatz 1:2000 übertragen und mit 2000 Lux belichtet. Die Vakuolisierung der roten „Näpfchen“-plastiden erfolgte durchschnittlich zur gleichen Zeit wie die der normalen Chloroplasten im Kontrollversuch. Abb. 15 a zeigt das anfängliche Abheben der Membran vom Gelkörper des Plastids, Abb. 15 b, c das fadenziehende Lösen des Gelkörpers von der sich ausdehnenden Plastidengrenzschicht. Mit fortschreitender Vakuolisierung noch mehr als 3 Stunden Belichtung

lockerte sich der bis dahin näpfenförmig erscheinende Gelkörper unter Größenzunahme auf und erfüllte bald netzartig das Innere des vakuolisierten Chloroplasten (Abb. 15 d). Den Größenverhältnissen entsprechend wäre dieses Stadium mit dem in der Endphase der Vakuolisierung auftretenden Vakuolentyp bei normalen Chloroplasten (Abb. 8 c) vergleichbar.

Um die Reversibilität der vakuolisierten „Näpfchen“-Plastiden zu prüfen, wurden nach jeder Stunde Belichtung des Blattmaterials in Rhodamin B 1:1000 mit Nikotinzusatz 1:2000 die Blätter gesondert in Leitungswasser übertragen und danach täglich im Lichtmikroskop untersucht. Bis zu 3 Stunden Belichtung war die Vakuolisierung reversibel. Die Gesamtgröße der netzartig gedehnten Chloroplasten (Abb. 15 d) hatte nach 10 Tagen Aufenthalt in Leitungswasser bis zu einem Durchmesser von $5,5 \mu$ abgenommen. Alle übrigen oben beschriebenen Vakuolisationsstadien waren vollkommen reversibel, so daß normale, linsenförmige Chloroplasten mit sichtbarer Granastruktur wiederhergestellt wurden. Nach vier und mehr Stunden Belichtung war jedoch die Vakuolisierung vollkommen irreversibel, und der Aufenthalt der Blätter in Leitungswasser verlief nicht mehr intravital.

Nach 10 Tagen Aufenthalt der belichteten Blätter in Leitungswasser wurde auch an dem reversibel vakuolisierten Material eine Wiederholung der Belichtungsversuche in Nikotinlösung vorgenommen. Die Chloroplasten

der bis zu 2 Stunden belichteten Blätter waren nach 10 Tagen Aufenthalt in Leitungswasser abermals im gleichen Maße vakuolisationsfähig. Die Chloroplasten der 3 Stunden in Rhodamin B 1 : 1000 mit Nikotinzusatz 1 : 2000 belichteten Blätter waren bei den Wiederbelichtungsversuchen nach 10 Tagen Aufenthalt in Leitungswasser gar nicht oder nur bis zu einem Durchmesser von 6μ wieder vakuolisierbar. — Durch diese Wiederbelichtungsversuche in Nikotinlösung konnte eine scharfe Trennung zwischen der

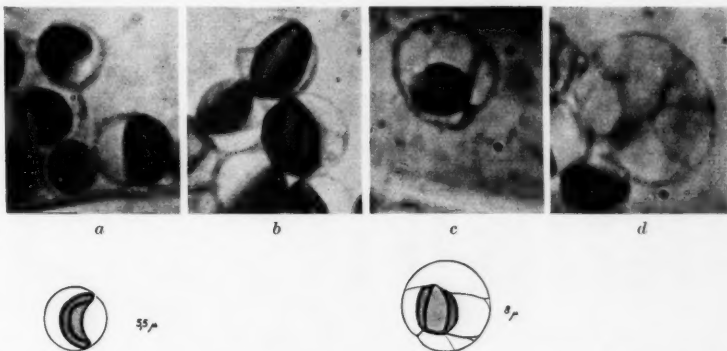


Abb. 15. Vakuolierte „Näpfchen“-Plastiden nach 4 bis 5 Std. Belichtung in Rhodamin B 1 : 1000 mit Nikotinzusatz 1 : 2000.

Reversibilität der vakuolierten „Näpfchen“-Plastiden und der vollen Vitalität dieser Plastiden vorgenommen werden.

VI. Besprechung der Versuchsergebnisse

Die Plastiden aller Entwicklungsstadien — mit Ausnahme der extrem vergilbten Plastiden mit einem Durchmesser von $1,8\mu$ — waren bei Belichtung in Nikotinlösung zur Vakuolenbildung befähigt. Struktureinheiten wie das zuerst von Strugger (1936, 1950, 1953, 1954) beobachtete scheibchenförmige Primärgranum der Proplastiden oder auch die Ausbildung von Trägerlamellensystemen bei multigranulären Jungchloroplasten wurden ohne Fixation und Färbung mit Hilfe der Vakuolisationsmethode deutlicher sichtbar. Durch die Vakuolisierung wurde ebenfalls die Existenz eines Peristromiums zwischen Gelkörper und Grenzsicht schon bei Jungchloroplasten wahrscheinlich. Bei vakuolierten Chloroplasten konnte die Lamellierung des gesamten Gelkörpers im Sinne des Schemas von Strugger (1951) im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden. Es wurde mit Hilfe eines Modells versucht, die netzartige Dehnung bei den vakuolierten Chloroplasten zu veranschaulichen, deren Durchmesser 9μ und mehr betrug (Abb. 16). Die Grana können demnach möglicherweise die Vernetzungspunkte der allseitig gedehnten Lamellensysteme darstellen. Die oben beschriebene Reversibilität dieses am stärksten ausgeprägten Vakuolisationsstadiums ist ebenfalls verständlich, wenn man sich im Modell-

versuch die Lamellensysteme (Abb. 16 b) wieder rückläufig zu einem kompakten Gelkörper (Abb. 16 a) zusammengelagert vorstellt. In diesem Sinne muß die von Lärz (1942) beschriebene „völlige Zerstörung der Plastidenstruktur durch netzartige Auflösung des Stromas“ berichtigt werden. — Bei der Vakuolisierung vergilbter Plastiden wurde die Reduktion der Lamellensysteme mit fortschreitender Altersvergilbung deutlich. Extrem vergilbte Plastiden bestanden offenbar nur noch aus 2 bis 3 granagroßen „Kugeln“ und einer Grenzschrift. Das Peristromium schien ebenfalls mit fortschreitender Vergilbung reduziert zu werden.

Die Vakuolisierungsmethode konnte als cytologische Funktionsprüfung der Plastiden angewandt werden, indem Größenmessungen der

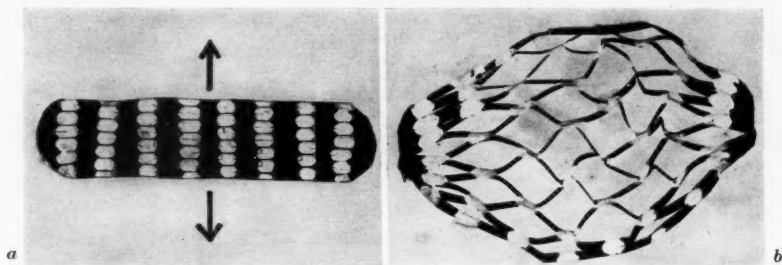


Abb. 16. Modell einer Chloroplastenlamelle oder eines Lamellenbündels. a vor und b nach mehrseitiger Dehnung.

vakuolisierten Plastiden vorgenommen wurden und diese Meßwerte mit der ursprünglichen Größe der Plastiden vor der Vakuolisierung verglichen wurden. Mit Hilfe dieser Methode konnte jedoch die Funktionsfähigkeit von Proplastiden und Chloroplasten nicht quantitativ miteinander verglichen werden. Beim Vergleich der strukturell so verschiedenen Proplastiden und Chloroplasten dürften diese Größenmessungen vakuolierter Plastiden nicht als Bezugseinheit herangezogen werden. Es bleibt dagegen beim Vergleich von Proplastiden und Chloroplasten hervorzuheben, daß beide ein Maximum der Funktionsfähigkeit nach 5 Stunden Belichtung zeigten. Das dürfte zumindest auf das Vorhandensein und die hohe Ordnung aller zur Funktionsleistung benötigten Strukturelemente schon im postembryonalen Stadium des Proplastids hindeuten. Wegen der grundsätzlichen morphologischen Gleichheit der Chloroplasten untereinander wäre hier die Möglichkeit gegeben, die Leistungsfähigkeit annähernd quantitativ durch Größenmessungen der Belichtungs-vakuolen zu bestimmen. Das würde eine methodische Erweiterung der von Lärz (1942) und Schmidt (1951) in die Cytologie eingeführten Bestimmung des osmotischen Wertes der Plastidenvakuolen in Abhängigkeit von der Belichtungszeit bedeuten. Während aber die osmotischen Werte der Vakuolen nur begrenzt bis zu 170 Minuten Belichtung und bis zur Konzentration von 1,2 mol Glukose bestimmt werden konnten, war die Bestimmung der Funk-

tionsfähigkeit mit Hilfe der in Kap. IV angegebenen Größenmessungen vakuolisierter Plastiden bei beliebig langer Belichtungsdauer möglich. Auf diese Weise wurden bei 10stündiger Versuchsdauer 2 Maxima der Funktionsintensität bei 5 und 9 Stunden Belichtung beobachtet. — Bei den Versuchen mit vergilbten Plastiden wurde festgestellt, daß mit fortschreitender Vergilbung eine immer längere Belichtungsdauer erforderlich war, um die Vakuolisierung hervorzurufen. Das gänzliche Ausbleiben der Vakuolenbildung bei extrem vergilbten Plastiden kann als qualitativer Beweis für die Funktionsuntüchtigkeit dieses letzten Reduktionsstadiums gelten. Die vergleichende Betrachtung von Struktur und Funktion der Plastiden ergab also auch hier generell eine Parallelbeziehung, da mit der Reduktion von Substanz und Ordnung der Strukturelemente beim vergilbenden Plastid auch eine zunehmende Funktionsbeeinträchtigung verbunden war.

Über die elektronenmikroskopische Feinbauanalyse der in der vorliegenden Arbeit lichtmikroskopisch untersuchten Plastiden wird gesondert berichtet.

Zusammenfassung

Im Sinne der von Strugger (1936, 1956) angeregten Verbindung der cytomorphologischen Analyse des Chloroplasten mit physiologischen Untersuchungen werden Plastiden verschiedener Entwicklungsstadien in Nikotinlösung belichtet und lichtmikroskopisch untersucht.

1. Die Vakuolisierungsmethode erweist sich als empfindliche und intravitale Nachweisreaktion für die Funktionstüchtigkeit der Plastiden. Chloroplasten irreversibel geschädigter Zellen sind nicht mehr im Licht vakuolisierbar.

2. Die Proplastiden postmeristematischer Blattmeristemzellen von *Helodea densa* sind durch die Belichtung in Nikotinlösung vakuolisierbar. Fluoreszenzmikroskopisch wird in diesen Proplastiden ein scheibchenförmiges, rot fluoreszierendes Primärgranum beobachtet. Bei allen Vakuolisierungsversuchen an Proplastiden sind lichtmikroskopisch Primärgrana, nicht lamellierte Stromaplasma und Grenzsicht ohne Fixation und Färbung in vivo als kontinuierliche Strukturelemente zu beobachten. Es wird weiterhin eine Entwicklungsfähigkeit ehemals vakuolisierter Proplastiden nachgewiesen.

3. Für die Jungchloroplasten wird lichtmikroskopisch mit Hilfe der Vakuolisierungsmethode die Lokalisation der Grana auf Trägerlamellensystem festgestellt.

4. Bei vakuolisierten Teilungsstadien erkennt man die schon erfolgte Teilung zu zwei oder mehreren lamellierten Gelbkörpern, welche aber noch von einer gemeinsamen Plastidengrenzschicht umspannt werden.

5. Bei der Vakuolisierung der Chloroplasten werden die einzelnen Bauelemente wie die Grenzschicht und das Peristromium deutlicher unterscheidbar. Die geordnet netzartige Ausdehnung des lamellierten Gelbkörpers bei der Vakuolisierung wird an Hand eines Modells rekonstruiert und zu erklären versucht.

6. Die Vakuolisierung erweist sich nur als Auflockerung und Dislozierung, nicht aber als Zerstörung der Bauelemente des Chloroplasten. Alle Vakuolisierungsstadien sind reversibel bis zur ursprünglichen Geldrollenstruktur des Chloroplasten. Nur Plastiden mit geplatzter Grenzscheid nach extrem langer Belichtungszeit sind in Struktur und Funktionsfähigkeit irreversibel geschädigt.

7. Die Reversibilität der Vakuolisierung erweist sich jedoch als nicht identisch mit der vollen Erhaltung der Vitalität der Plastiden. Bei Wiederbelichtungsversuchen ehemals vakuolisierter Plastiden, welche in Leitungswasser weitgehend ihre normale Struktur wiedererlangt hatten, ist eine erneute Vakuolisierung durch abermalige Belichtung in Nikotinlösungen zwar erreichbar, aber nicht mehr bei jedem der verschieden lang belichteten Blattmaterialien im gleichen Maße wie beim ersten Belichtungsversuch.

8. Es wird versucht, die physiologische Leistungsfähigkeit der Chloroplasten durch Größenmessung ihrer Belichtungs-vakuolen annähernd quantitativ zu bestimmen. Danach ergeben sich im Laufe der Belichtung stets 2 Maxima der Funktionsintensität (5 und 9 Std. Belichtung).

9. Chloroplasten werden in Rhodamin B 1:1000 experimentell zu „Näpfchen“-plastiden verändert. Diese sind noch nach 12 Stunden Aufenthalt in Rhodamin B 1:1000 bei Belichtung in Nikotinlösung vakuolisierbar. Erst danach nimmt ihre Funktionsfähigkeit ab. Bis zu einem 12stündigen Aufenthalt in Rhodamin B 1:1000 in Leitungswasser sind die „Näpfchen“-Plastiden und die vakuolisierten „Näpfchen“-Plastiden noch vollkommen reversibel.

10. Vergilbte Plastiden erleiden im Zuge ihrer Degeneration eine Reduktion der Lamellensysteme, was beim Vakuolisierungsexperiment deutlich zum Ausdruck kommt. Parallel zu der Reduktion von Substanz und Ordnung der Strukturelemente bei der Vergilbung ist auch eine abnehmende Funktionsfähigkeit zu bemerken. Extrem vergilbte Plastiden sind überhaupt nicht mehr bei Belichtung in Nikotinlösung vakuolisierbar.

Die Arbeit wurde als Teil einer Dissertation am Botanischen Institut der Universität Münster/Westfalen ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. S. Strügger, danke ich für die Überlassung des Themas und das ständige, fördernde Interesse, welches er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Literatur

- Bauer, L., 1942: Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte und Physiologie der Plastiden von Laubmoosen. *Flora* 136, 30.
- Böing, J., 1953: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Chloroplasten. Diss. Bot. Inst. Münster.
- 1956: Vitaluntersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Chloroplasten von *Helodea densa*. *Protoplasma* 45, 55.
- Fasse-Franzisket, U., 1956: Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus* L'Hérit. *Protoplasma* 45, 194.
- Gahlen, K., 1954: Beiträge zur Physiologie der Blattzellen von *Helodea canadensis*. *Protoplasma* 22, 337.

- Hanssen, E., 1947: Untersuchung über die Einwirkung von Alkaloiden und einigen Anaesthetica auf die Pflanzenzelle. Diss. Techn. Hochsch., Hannover.
- Lärz, H., 1942: Beiträge zur Pathologie der Chloroplasten. *Flora* 155, 519.
- Lilienstern, M., 1935: Altersunterschiede von Zellen einiger Wasserpflanzen in Bezug auf ihr Reduktionsvermögen. *Protoplasma* 23, 86.
- Lindner, H., 1959: Die lichtabhängige Vakuolisierung der Chloroplasten in Nikotinlösungen. II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Protoplasma*, im Druck.
- Mudrack, K., 1956: Experimentelle Untersuchungen an isolierten Chloroplasten. *Protoplasma* 46, 556.
- Perner, E. S., 1950: Die intravitale Fluorochromierung junger Blätter von *Helodea densa*. Ein Beitrag zur weiteren Aufklärung der entwicklungsphysiologisch bedingten Färbegradienten. *Protoplasma* 39, 400.
- Schmidt, H. H., 1951: Studien zur experimentellen Pathologie der Chloroplasten. I. Untersuchungen über die Vakuolenbildung der Chloroplasten durch Alkaloide und Anaesthetica. *Protoplasma* 40, 209.
- 1951: II. Untersuchungen über die Streifen- und Näpfchenbildungen der Chloroplasten. *Protoplasma* 40, 507.
- Strügger, S., 1935: Beiträge zur Gewebephysiologie der Wurzel. Zur Analyse und Methodik der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma* 24, 108.
- 1936: Vitalfärbung der Chloroplasten mit Rhodaminen. *Flora* 151, 115.
- 1937: Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Chloroplasten mit Rhodaminen. *Flora* 151, 324.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. *Naturw.* 37, 166.
- 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 64, 69.
- 1953: Über die Struktur der Proplastiden. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 66, 439.
- 1954: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Hérit. *Protoplasma* 43, 120.
- 1954: Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis des primären Granums in den Proplastiden. *Naturw.* 41, 286.
- und M. Losada-Villasante, 1956: Die Plastiden in den albicaten Geweben der Blätter einer mediovariegaten Form von *Chlorophytum comosum*. *Protoplasma* 45, 540.

Die Wirksamkeit verschiedener Wuchs- und Hemmstoffe in gepufferten Lanolinpasten verschiedener Wasserstoffionenkonzentration

Von

Hans Linser und Oswald Kiermayer

Aus der Biologischen Forschungsabteilung der Österreichische Stickstoffwerke A. G.,
Linz (Leiter: Doz. Dr. H. Linser)

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Juli 1958)

1. Einleitung

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Wuchsstoffwirkung wurde bereits vielfach untersucht. So berichtete schon Bonner (1934), daß Koleoptilzellen bei pH 4,0 eine größere Zellstreckung zeigen als im neutralen pH-Bereich. Bonner kam zu dem Schluß, daß das freie, undissoziierte Wuchsstoffmolekül wirksam ist und Van Santen (1938) zeigte, daß im pH-Bereich von 4,2 bis 5,8 der pH-Einfluß auf die Zellstreckung der Titrationskurve der Wuchsstoffdissoziation entspricht. Weygand und Wehnelt (1942) und Söding (1952) fanden, daß durch saure Salze die wuchsstoffinduzierte Wurzelbildung gefördert wird.

Auch Simon (1950) wies darauf hin, daß allgemein die undissoziierten Moleküle wirksamer erscheinen als die dissoziierten. Hammer et al. (1947) und Mitchell et al. (1949) zeigten, daß 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure bei tieferem pH stärker wirksam ist als bei höheren Werten, und Rietsema (1949) fand das Optimum der Zellstreckungswirksamkeit ebenfalls im sauren Bereich. Akamine (1951) stellte fest, daß 2,4-D in einem Boden von hohem pH-Wert schneller inaktiviert wird als bei niederem pH und Blackman und Robertson-Cunninghame (1953) zeigten an *Lemna minor*, daß das Optimum an Wachstumsverminderung durch 2,4-D bei pH 4,6 erreicht wird. Ferner konnte Linser (1954) zeigen, daß im Pastentest die freie β -Naphthoxyessigsäure in höherer Konzentration eine Hemmwirkung ausübt, welche die Alkalisalze derselben Säure nicht zeigen. Bei Versuchen mit gepufferten Lanolinpasten erwies sich, daß das Kaliumsalz der β -Naphthoxyessigsäure nur im sauren Bereich hemmend wirkt, im

alkalischen dagegen inaktiv ist. Auch Indol-3-essigsäure besaß im sauren Bereich bei hoher Konzentration eine stärkere Hemmkomponente als im alkalischen.

Nach den genannten Literaturangaben zu urteilen, scheint es nun sicher, daß dem undissoziierten Molekül die größere Wirkung zukommt als den Ionen. Allerdings ist die Frage noch ungeklärt, ob der Wirksamkeitsunterschied von dissoziierten oder undissoziierten Molekülen auf eine verschieden starke Intrabilität (oder Permeabilität) von Molekülen und Ionen zurückzuführen ist, oder ob zwischen beiden Formen qualitative Unterschiede bezüglich ihrer Zellstreckungswirksamkeit bestehen.

In den nachfolgenden Untersuchungen sollte mit Hilfe des Pastentestes studiert werden, in welchem quantitativen Ausmaß die Wasserstoffionenkonzentration die Wirksamkeit von Wuchs- und Hemmstoffen beeinflusst. Daneben sollten auch ungepufferte Wuchsstoffpasten im Vergleich zu gepufferten untersucht werden.

2. Methodik

Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden mit Hilfe der Pastenmethode (nach Linser 1938) an *Avena*-Koleoptilen durchgeführt. Und zwar wurden die Lanolinpasten durch Vermischen von Pufferlösung mit Wollfett (1 : 1) hergestellt und diese Pasten mit dem zu testenden Wirkstoff versetzt. Als Puffer kam der bei Strügger (1949) beschriebene Phosphat-Puffer ($\frac{1}{15}$ mol prim. Kaliumphosphat, $\frac{1}{15}$ mol sec. Natriumphosphat, $\frac{1}{15}$ mol tert. Kaliumphosphat) in entsprechender Mischung zur Anwendung. Bei Vorversuchen wurde festgestellt, daß die reinen Puffer in Lanolinpaste ohne Wirkstoffzusatz keinen merklichen Zellstreckungseffekt auf die Haferkoleoptilen ausübten.

An Wirkstoffen kamen 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (Na-Salz), 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (Na-Salz), 2,4,6-Trichlorphenoxyessigsäure (Na-Salz) und Eosin in Konzentrationen von 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} und 10% zur Anwendung.

3. Versuchsergebnisse

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Na zeigte bei einem pH von 3,4 bis 3,9 seine stärkste Wirksamkeit und zwar lag das Wirkungsoptimum bei einer Konzentration von $10^{-2}\%$, während bei $10^{-1}\%$ bereits eine Hemmung auf 0,8% eintrat (Abb. 1). Schon bei einem etwas höheren pH-Wert (5,6 bis 5,7) trat ein starker Wirksamkeitsverlust ein, so daß das Optimum bei $10^{-1}\%$ zu liegen kam. Bei pH 5,6 bis 5,7 war also die Wirksamkeit schon auf etwa $\frac{1}{10}$ abgefallen gegenüber dem Wert bei pH 3,4 bis 3,9. Allerdings war hier der Zuwachswert höher als bei niedrigerem pH und das Optimum wurde bei Z % = 51,3 erreicht. Dies könnte vermuten lassen, daß die Hemmungskomponente der Wirkungskurve stärker vom pH-Wert beeinflusst wird als die Förderungskomponente. Eine weitere Steigerung des pH-Wertes führte zu keinem weiteren stärkeren Wirkungsverlust; erst bei pH 11,2 bis 11,3 trat wieder eine stärkere Wirksamkeitsschwächung ein, wodurch bei einer Konzentration von 10% keine Hemmwerte, sondern auch hier noch

Förderungswerte erzielt wurden. Bei 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Na ergab somit ein pH von 3,4 bis 3,9 die stärkste Wirksamkeit während Steigerung des pH-Wertes einen starken Wirksamkeitsverlust zur Folge hatte.

Interessant war ein Vergleich der Wirksamkeit von 2,4-D-Na in gepufferten und ungepufferten Pasten. Hier zeigte sich (vgl. Tab. 1), daß bei ungepufferten Pasten das Wirkungsoptimum zwar bei $10^{-2}\%$ so wie im

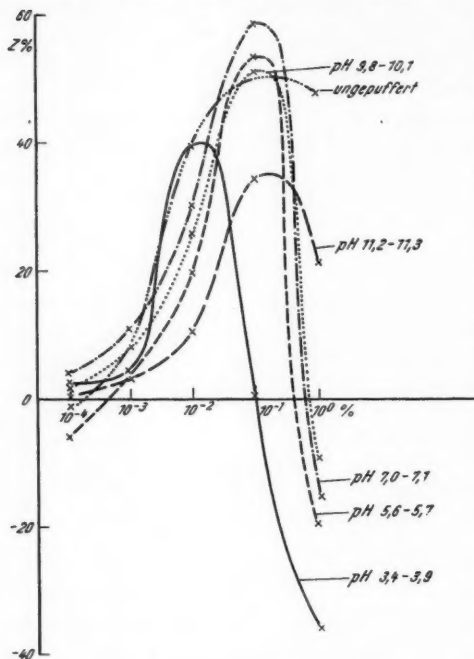


Abb. 1. Konzentrations-Wirkungskurven von 2,4-dichlorphenoxyessigsäure-Na ungepuffert und bei verschiedenem pH. Ordinate Z%, Abszisse = Konzentration in %.

stark sauren Bereich erreicht wird, daß jedoch bei $10^0\%$, wo bei gepufferten Pasten bis zu pH 9,8 bis 10,1 eine Hemmwirkung eintrat, noch hohe (+ 48,0%) Förderungswerte erhalten werden. Es scheint somit sicher, daß in ungepufferten Pasten bei stärkerer Konzentration nicht die volle Wirksamkeit von 2,4-D-Na erreicht wird, wie dies bei einem pH-Wert von 3,4 bis 3,9 der Fall ist. Es ist ferner auffallend, daß sich bei den gepufferten Pasten Kurven mit sehr deutlich ausgeprägtem Optimum und einer deutlichen Hemmkomponente ergeben, daß dagegen in ungepufferten Pasten ein breiterer Optimumbereich (von 10^{-2} bis $10^0\%$) und keine Hemmkomponente auftritt. Daß bei ungepufferten Pasten die maximale Wirkung von 2,4-D-Na nicht erreicht wird, ist ferner daran ersichtlich, daß bei pH 3,4 bis 3,9 und $10^{-1}\%$ bereits eine Hemmwirkung (auf 0,8%) eintrat, wäh-

rend bei ungepufferten Pasten bei der gleichen Konzentration eine Förderung von + 50,1% erzielt wurde.

Die Verzerrung der Konzentrations-Wirkungskurve bei ungepufferten Pasten läßt sich vielleicht folgendermaßen erklären: Die zur Lösung der Substanzen verwendete Lanolinpaste hat normalerweise ein pH, das im sauren Bereich (um pH 5 bis 6) liegt. Bei Zugabe von Wuchsstoff-Salzen (z. B. 2,4-D-Na) in schwacher Konzentration z. B. $10^{-2}\%$ wird dieser pH-Wert, wenn überhaupt, so doch nur ganz gering beeinflusst werden. Aus diesem Grunde sind bei schwachen Konzentrationen Wirkungswerte zu erwarten, wie sie im sauren Bereich (pH-Bereich der Pasten) erzielt

werden und daher dementsprechend hoch sind. Wird nun die Konzentration erhöht, so steigt in ungepufferten Pasten durch Einfluß des Salzes der pH-Wert gegen den alkalischen Bereich zu an, womit verbunden eine Wirksamkeitsverminderung eintritt. Bei 2,4-D-Na z. B. wird bei 10⁻²% von der ungepufferten Paste dieser Konzentration im sauren Bereich (pH 3,4 bis 3,9) der erzielbare Optimalwert von $Z\% = 40,5$ erreicht, d. h. daß hier noch keine Wirksamkeitsverminderung eintrat, weil noch der saure pH-Wert der Paste herrschte. Wird aber die Konzentration auf 10⁻¹% erhöht, so tritt bei der auf pH 3,4 bis 3,9 gepufferten Paste bereits eine Hemmung (im vorliegenden Versuch auf +0,8%) ein, während der Wert

Tab. 1. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Na in Gegenwart von Puffern mit verschiedenem pH. (Die Zahlen stellen Durchschnittswerte aus zwei nicht gleichzeitig durchgeführten Versuchen dar. Die Werte für die ungepufferten Pasten stellen Durchschnittswerte aus 52 nicht gleichzeitig durchgeführten Versuchen dar.)

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Na		10 ⁻⁴ %	10 ⁻³ %	10 ⁻² %	10 ⁻¹ %	10 ⁰ %
pH	un gepuffert	- 0,5	+ 9,4	+ 40,3	+ 50,1	+ 48,0
	3,4 - 3,9	+ 2,2	+ 4,1	+ 39,4	+ 0,8	- 36,1
	5,6 - 5,7	- 6,0	+ 3,8	+ 19,7	+ 51,3	- 19,2
	7,0 - 7,1	+ 3,9	+ 10,9	+ 30,2	+ 58,6	- 15,1
	9,8 - 10,1	+ 1,8	+ 7,7	+ 25,9	+ 51,3	- 9,9
	11,2 - 11,3	+ 0,5	+ 3,4	+ 10,2	+ 34,1	+ 21,1

bei der ungepufferten Paste noch weiter (auf + 50,1%) ansteigt, auf einen Punkt, der bei dieser Konzentration für einen höheren pH-Wert charakteristisch ist (vgl. Abb. 1). In der ungepufferten Paste trat somit durch die pH-Erhöhung bei dieser Konzentration bereits ein markanter Wirksamkeitsverlust ein. Bei noch weiterer Steigerung der Konzentration auf 10⁰% bleibt bei der ungepufferten Paste der Zuwachswert weiterhin im hoch fördernden Bereich ($Z\% = + 48,0$) und ändert sich gegenüber der 10 \times schwächeren Konzentration kaum. Da die Werte alle ab 10⁻²% um 40–50% liegen, ergibt sich eine breite Kurve ohne Hemmkomponente, bei der nur der Punkt bei 10⁻²% der vollen Wirksamkeit der Substanz entsprechen dürfte, die anderen höheren Werte aber durch eine pH-Verschiebung stark geschwächt erscheinen.

2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure-Na zeigte so wie 2,4-D seine stärkste Wirksamkeit bei pH 3,4 bis 3,9; allerdings wurde die Wirksamkeit auch bei pH 5,6 bis 5,7 noch nicht herabgesetzt. Auch bei einem pH-Wert von 7,0 bis 7,1 betrug die Wirksamkeit nur etwa $\frac{1}{3}$ von jener im sauren Bereich. Eine etwa 10 \times verminderte Wuchsstoffwirkung trat erst bei pH 9,8 bis 10,1 ein. Bei pH 11,2 bis 11,3 lag das Wirkungsoptimum zwar bei der gleichen Konzentration wie bei pH 9,8 bis 10,1, doch waren die Zuwachswerte geringer und bei 10⁰% trat keine Hemmung mehr ein (vgl. Abb. 2). Die stärkste Zellstreckungswirksamkeit übt 2,4,5-T-Na somit ebenfalls im sauren Bereich

(pH 3,4 bis 5,7) aus, während im neutralen, vor allem aber im alkalischen Bereich (pH 9,8 bis 11,3) ein starker Wirksamkeitsverlust eintritt.

Bei ungepufferten Pasten konnte mit dieser Substanz die gleiche Beobachtung gemacht werden, wie mit 2,4-D-Na: das Optimum wurde auch

Tab. 2. 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure-Na in Gegenwart von Puffern mit verschiedenem pH. (Die Zahlen stellen Durchschnittswerte aus zwei nicht gleichzeitig durchgeführten Versuchen dar. Die Werte für die ungepufferten Pasten stellen Durchschnittswerte aus 13 nicht gleichzeitig durchgeführten Versuchen dar.)

2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure-Na		10-4%	10-3%	10-2%	10-1%	10 ⁰ %
pH	ungepuffert	- 0,8	+ 17,7	+ 49,1	+ 21,0	+ 1,8
	3,4 - 3,9	+ 11,2	+ 18,7	+ 48,5	+ 4,9	+ 31,6
	5,6 - 5,7	- 0,3	+ 17,0	+ 49,8	+ 2,2	- 24,1
	7,0 - 7,1	- 1,6	+ 9,8	+ 33,7	+ 34,0	- 21,0
	9,8 - 10,1	+ 5,0	+ 1,1	+ 33,4	+ 52,5	- 17,3
	11,2 - 11,3	- 0,7	+ 6,2	+ 20,8	+ 42,1	+ 22,6

hier bei 10-2% erreicht, der Abfall an Förderungswirksamkeit bei zunehmender Konzentration war aber bedeutend flacher und es wurden hier bis zu 10⁰% keine Hemmungswerte erzielt, während bei pH 3,4 bis 3,9 eine Hemmung auf - 31,6% eintrat (vgl. Tabelle 2).

Tab. 3. 2,4,6-Trichlorphenoxyessigsäure-Na in Gegenwart von Puffern mit verschiedenem pH. (Die Zahlen stellen Durchschnittswerte aus zwei nicht gleichzeitig durchgeführten Versuchen dar. Die Werte für die ungepufferten Pasten stellen Durchschnittswerte aus 4 nicht gleichzeitig durchgeführten Versuchen dar.)

2,4,6-Trichlorphenoxyessigsäure-Na		10-4%	10-3%	10-2%	10-1%	10 ⁰ %
pH	ungepuffert	- 5,0	- 1,9	- 2,1	- 14,3	- 37,8
	3,4 - 3,9	+ 3,9	+ 3,8	- 10,0	- 49,4	- 71,2
	5,6 - 5,7	- 0,1	+ 1,3	+ 2,4	- 32,9	- 62,9
	7,0 - 7,1	+ 0,2	- 3,4	+ 1,0	- 12,9	- 42,5
	9,8 - 10,1	+ 3,8	+ 3,0	- 2,4	+ 0,7	- 43,8
	11,2 - 11,3	+ 4,7	+ 7,7	+ 8,5	+ 2,6	- 42,2

2,4,6-Trichlorphenoxyessigsäure-Na ergab ebenso wie die beiden vorher genannten Substanzen bei pH 3,4 bis 3,9 ihre stärkste zellstreckungshemmende Wirkung. Bei Steigerung des pH-Wertes trat auch hier eine Verminderung der Wirksamkeit ein, die bei einem pH von 9,8 bis 10,1 und 11,2 bis 11,3 sowie einer Konzentration von 10-1% zur vollkommenen Wirkungslosigkeit führte, während bei einem pH von 3,4 bis 3,9 und gleicher Konzentration eine Hemmwirkung von - 49,4% erreicht wurde. Bei stark alkalischen Pasten (pH 11,2 bis 11,3) konnten bei den schwächeren Konzentrationen sogar Förderungswerte erhalten werden.

Wie Abb. 3 zeigt, lassen sich die Kurven durch die Wirksamkeits-

schwächung annähernd parallel entlang der Abszissenachse verschieben. Allerdings tritt bei zunehmender Wirksamkeitsschwächung zusätzlich eine schwache Erhöhung der Z-%-Werte ein.

Ein Vergleich der gepufferten Pasten zu ungepufferten ergab auch hier (bei einem Hemmstoff) eine starke Wirksamkeitsminderung und Verzerrung der Kurve bei ungepufferten Pasten. So war bei einer Konzentration von

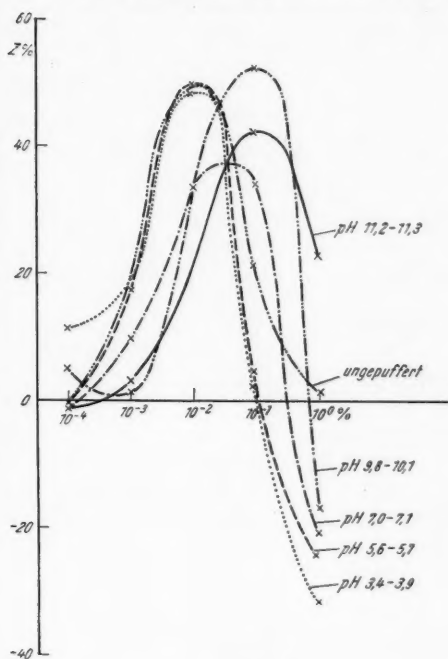


Abb. 2.

Abb. 2. Wie Abb. 1, jedoch für 2, 4, 5-trichlorphenoxyessigsäures-Na.

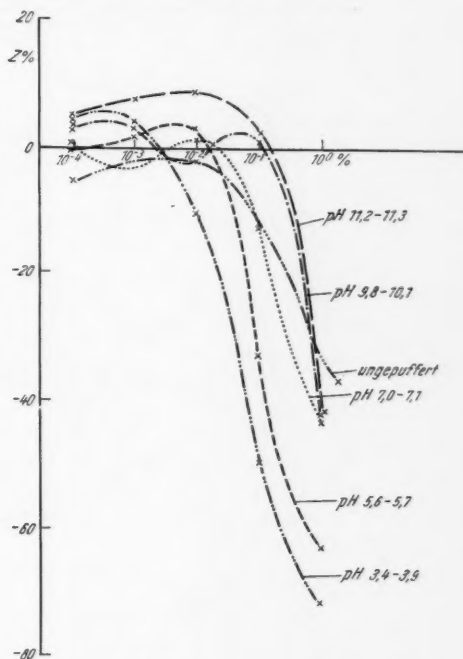


Abb. 3.

Abb. 3. Wie Abb. 1 und 2, jedoch für 2, 4, 6-trichlorphenoxyessigsäures-Na.

$10^{-1}\%$ und einem pH von 3,4 bis 3,9 die Hemmung — 49,4%, während sie bei gleicher Konzentration, aber ungepuffert, nur — 14,3% betrug.

Eosin ergab bei zunehmendem pH ebenfalls eine starke Wirksamkeitssenkung (vgl. Abb. 4). Der Wirkungsfall trat hier aber erst ab einem pH von 9,8 bis 10,1 in Erscheinung. In diesem pH-Bereich war die Wirkung einer $10^{-3}\%$ igen Paste + 0,9%, während bei gleicher Konzentration und einem pH von 3,4 bis 3,9 ein Hemmungswert von — 41,9% erzielt wurde (vgl. Tab. 4). Eine Parallelverschiebung der Wirkungskurve ist, wie Abb. 4 zeigt, auch hier möglich, mit der Einschränkung, daß die Kurven mit zunehmender Wirksamkeitsschwächung „steigen“, d. h. daß die Z-%-Werte gegen den Förderungsbereich zu leicht ansteigen.

Tab. 4. *Eosin in Gegenwart von Puffern mit verschiedenem pH.* (Die Zahlen stellen Durchschnittswerte aus zwei nicht gleichzeitig durchgeführten Versuchen dar. Die Werte für die ungepufferten Pasten stellen Durchschnittswerte aus 8 nicht gleichzeitig durchgeführten Versuchen dar.)

Eosin		10 ⁻⁴ %	10 ⁻³ %	10 ⁻² %	10 ⁻¹ %	10 ⁰ %
pH	ungepuffert	— 2,1	— 36,4	— 61,6	— 76,1	— 84,9
	3,4 — 3,9	— 1,6	— 41,9	— 63,2	— 78,3	— 85,4
	5,6 — 5,7	— 3,9	— 43,5	— 57,5	— 79,4	— 88,7
	7,0 — 7,1	+ 10,2	— 40,0	— 56,5	— 75,5	— 80,5
	9,8 — 10,1	— 2,5	+ 0,9	— 37,1	— 54,4	— 70,1
	11,2 — 11,3	— 0,2	+ 6,1	— 7,1	— 42,2	— 62,8

Die ungepufferten Pasten ergaben hier die gleichen Werte wie die stark sauren Pasten. Dies dürfte darauf beruhen, daß Eosin, ein saurer Farbstoff aus der Fluoreszeinreihe, in der Paste als undissoziiertes, molekular gelöstes Farbsalz oder in Form der Farbsäure vorliegt und daher auch bei starker Konzentration den pH-Wert der Paste selbst nicht wesentlich verändert.

Wie oben erwähnt, tritt ein starker Wirkungsverlust vor allem zwischen einem pH-Bereich von 7,0 bis 7,1 und 9,8 bis 10,1 ein, während die Kurven von pH 3,4 bis 7,1 und auch die Kurven der ungepufferten Paste „gebündelt“, d. h. annähernd gleich verlaufen (Abb. 4). Der Wirkungsabfall tritt also gerade im Umschlagsbereich des Eosins auf, wo sich der Wechsel von der undissoziierten zur dissoziierten Form vollzieht.

4. Diskussion der Ergebnisse

Da die Wirksamkeitsveränderung sehr auffällig dem Dissoziationsgrad des Stoffes entspricht (Parallelverschiebung der Wirkungskurven!) und bei Wuchs- wie auch bei Hemmstoffen ähnlich ist, darf man in Analogie zu den Erfahrungen der Zellphysiologie auch hier annehmen, daß die Wirkungsunterschiede bei verschiedenen pH auf Unterschiede im Intrabilitäts- bzw. Permeationsverhalten der Stoffe beruhen. Wenn angenommen wird, daß nur die undissoziierten Moleküle in das Plasma gelangen können, dissoziierte Ionen aber von der Zellwand adsorbiert werden und ihnen der Eintritt in das Zellinnere versagt bleibt, lassen sich die beschriebenen Versuchsergebnisse leicht wie folgt interpretieren: Je höher der pH-Wert steigt, desto mehr werden die hier verwendeten Wuchsstoffe in die dissoziierte Form übergeben und desto weniger wird von ihnen an die Wirkungsorte im Plasma gelangen können. Es dürfte sich somit bei dem pH-bedingten Wirkungsabfall um einen vorwiegend quantitativen Vorgang handeln. Ein prinzipiell anderes qualitatives Verhalten von Molekülen und Ionen erscheint jedoch nach den geschilderten Versuchen nicht absolut ausgeschlossen. Dafür spräche das vielfach beobachtete „Ansteigen“ der Z.-%-Werte bei zunehmendem Wir-

kungsverlust. So beträgt beispielsweise das Wirkungsoptimum bei 2,4-D-Na ($10^{-2}\%$ bei pH 3,4 bis 3,9) + 39,4%, bei pH 7,0 bis 7,1 und $10^{-1}\%$ dagegen + 58,6%. Bei einem pH von 7,0 bis 7,1, bei welchem neben Molekülen auch bereits eine große Menge Ionen vorliegen (dadurch der Wirkungsabfall) üben die Ionen vielleicht einen „sensibilisierenden Effekt“ auf die Zellen

der *Avena*-Koleoptilen aus, wodurch diese zwar erst bei höherer Konzentration (geringere Menge an Molekülen) dafür aber mit einer verstärkten Zellstreckung (Z %) antworten. Jedenfalls darf nicht außer acht gelassen werden, daß wir es in den genannten pH-Bereichen mit einem (dem pH-Wert entsprechenden) Gemisch an Molekülen und Ionen zu tun haben und wir daher mit Wechselwirkungen von Ionen und Mo-

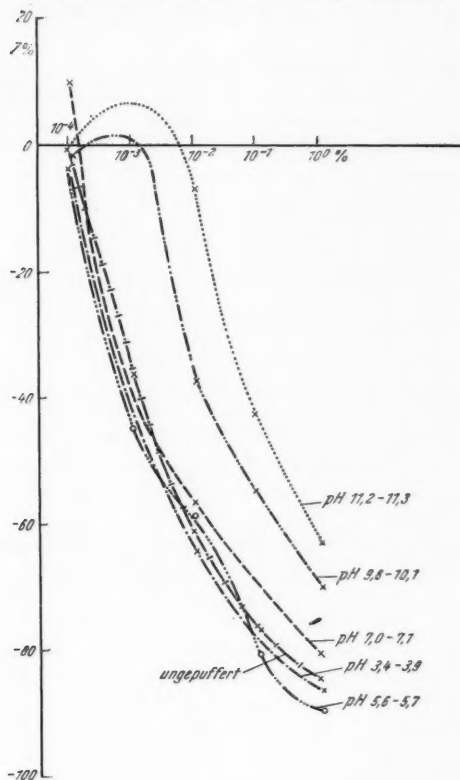


Abb. 4.

Abb. 4. Wie Abb. 1, 2 und 3, jedoch für Eosin.

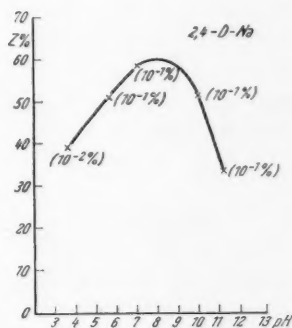


Abb. 5.

Abb. 5. Graphische Darstellung der jeweils in einem bestimmten pH-Bereich (Abszisse) erzielten Optima an Zuwachswerten (Ordinate).

lekülen rechnen müssen. Man könnte sich z. B. vorstellen, daß eine von Wirkstoffionen elektroadsorptiv beladene Zellwand durch die ins Plasma eingedrungenen Moleküle anders reagiert als eine unbeladene Membran. Jedenfalls dürfte sich hier ein Weg zum genaueren Studium der Wirkung von Wuchsstoffionen und -molekülen anbahnen.

In Abb. 5 ist versuchsweise eine Kurve von 2,4-D-Na wiedergegeben, bei welcher auf der Ordinate die optimalen Z %-Werte beim jeweiligen

pH-Wert (Abszisse) aufgetragen sind. Es ist daraus ersichtlich, daß die Wirkungsoptima eine typische Glockenkurve mit einem Optimum bei pH 7 bis 9 ergeben und die Minima im stark sauren (pH 3 bis 5) und stark alkalischen (pH 10 bis 12) Bereich liegen. Vielleicht drückt diese Kurve jenen einstweilen noch unbekannten Effekt graphisch aus, der von dem Gemisch Ionen-Moleküle ausgelöst wird und weiter oben als „sensibilisierender Effekt“ bezeichnet wurde.

Es muß aber auch noch eine andere Möglichkeit der Deutung in Betracht gezogen werden, welche das Ansteigen der Z.-%-Werte bei zunehmendem Wirkungsverlust verständlich machen könnte.

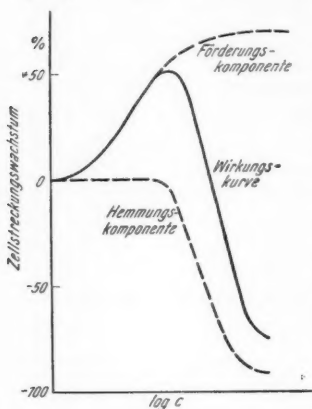


Abb. 6. Schematische Darstellung der Zerlegung der Wirkungskurve eines „typischen Wuchsstoffes“ in eine Förderungs- und eine Hemmungskomponente.

Die Konzentrations-Wirkungskurve eines typischen Wuchsstoffes (wie z. B. 2,4-D) kann aus zwei verschiedenen Wirkungskomponenten zusammengesetzt aufgefaßt werden: einer S-förmig aufsteigenden der reinen Zellstreckungsförderung und einer absteigenden der reinen Zellstreckungshemmung (vgl. Abb. 6 sowie Linser und Kiermayer 1957). Die gleichzeitige Wirkung der beiden, zwar von der gleichen Substanz ausgeübten, aber voneinander doch unabhängig zu denkenden Komponenten ergäbe dann die experimentell gefundene Form der Konzentrations-Wirkungskurve als eine Resultierende aus den beiden Komponenten. Jede der beiden Komponenten könnte nun für sich eine bestimmte Abhängigkeit von der Konzentration besitzen, die je nach der chemischen Qualität des Moleküls verschieden sein könnte; d. h., daß der Wendepunkt der S-Kurven in ihrer Lage im Hinblick auf die Konzentration von der chemischen

Struktur des Moleküls bestimmt wäre. Die resultierende Form der Konzentrations-Wirkungskurve besäße dann ein um so höher liegendes Maximum, je größer der Unterschied der Konzentrationen bei den Wendepunkten der Kurven der beiden Wirkungskomponenten wird. Nehmen wir an, die Förderungskomponente bliebe unabhängig vom pH-Wert der Paste, die Hemmungskomponente aber verschiebe mit steigendem pH-Wert ihren Wendepunkt zu größeren Konzentrationen, so würde das Förderungsoptimum breiter werden und zu höheren Z.-%-Werten ansteigen.

Man könnte daher mit einiger Berechtigung die Hypothese aufstellen, daß die experimentell beobachtete Wirkungskurve als das resultierende Ergebnis aus der Wirkung zweier verschiedener vorliegender Formen des gleichen Wirkstoffes zu betrachten sei; des nichtionisierten Moleküls und des Ions. Es ergäbe sich dann die Frage, ob nicht die ionisierte Form des Moleküls eine wachstumsfördernde Wirkung ausübt (und für die aufsteigende S-förmige Komponente verantwortlich ist) und eine zellstreckungs-

hemmende Wirkung nur der nicht ionisierten Form zukommt (welche die absteigende S-förmige Komponente liefert). Die verschiedenartigen Formen der Konzentrations-Wirkungskurven bei verschiedenen pH-Werten würden durch eine solche Annahme ihre Erklärung finden. Damit könnte auch die Annahme verbunden werden, daß die verschiedenartige Wirkung von Molekül einerseits und Ion andererseits durch ihr verschiedenartiges Verhalten beim Eindringen, bzw. durch ihre Adsorption an verschiedenartigen Stellen des reagierenden Systems zustandekommt.

Wir glauben nicht, daß das experimentelle Material der vorliegenden Arbeit ausreicht, um diese Hypothese oder deren zusätzliche Annahmen beweisen oder entkräften zu können, sind aber der Meinung, daß die entwickelte Vorstellung die Basis für weitere klärende Arbeit auf diesem Gebiete bilden könne. Würde es doch einen bedeutenden Fortschritt auf dem Wege zur Kenntnis des Wirkungsmechanismus der Zellstreckungswirkstoffe bedeuten, wenn es gelänge, die Herkunft der fördernden und der hemmenden Komponente dieser Stoffe in ihrer Abhängigkeit von der chemischen Struktur des betreffenden Moleküls kennenzulernen.

Eine praktische Schlußfolgerung für die serienmäßige Testung von Stoffen mit dem Pastentest kann aus den geschilderten Ergebnissen aber schon jetzt gezogen werden, nämlich die, daß Substanzen nicht in ungepufferten Pasten, sondern sowohl in sauren Pasten (pH 3 bis 4) als auch in alkalischen Pasten (pH 10 bis 11) zur Testung gelangen sollten. Zwar besitzen unsere meisten Wuchsstoffe Säurecharakter und es würde für sie genügen, sie im sauren Bereich zu testen; bei unbekannten, möglicherweise basischen Stoffen ist es aber unbedingt notwendig, außerdem im alkalischen Bereich zu prüfen, da sonst eine Wirkung, wenn überhaupt, so nur schwach erkennbar werden würde. Die ideale Lösung wäre, alle Substanzen in einer pH-Reihe zu testen. Dies wäre aber für serienmäßige Testungen zu umständlich und zeitraubend.

Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wird über Versuche mit gepufferten und ungepufferten Lanolinpasten im Pastentest berichtet.

2. Es wurde festgestellt, daß bei 2,4-dichlorphenoxyessigsäure-Na, 2,4,5-trichlorphenoxyessigsäure-Na, 2,4,6-trichlorphenoxyessigsäure-Na und Eosin bei zunehmendem pH ein starker Wirksamkeitsverlust eintritt.

3. Die Konzentrations-Wirkungskurven lassen sich bei den pH-bedingten Wirksamkeitsverlust durch Verschiebung parallel entlang der Abszissenachse grob zur Deckung bringen. Bei zunehmender Wirkungslosigkeit tritt jedoch zusätzlich ein schwaches Ansteigen der Z-%-Werte gegen den Förderungsbereich hin ein.

4. Die stärkste zellstreckungsfördernde bzw. -hemmende Wirkung trat bei allen geprüften Substanzen bei einem pH von 3,4 bis 3,9 ein.

5. Ungepufferte Pasten der untersuchten substituierten Phenoxyessigsäuresalze ergaben gegenüber gepufferten Pasten bei den stärkeren Konzentrationen stark verminderte Wirkungswerte. Dies ist auf eine pH-Erhöhung der ungepufferten Pasten, welche durch den Einfluß der stärker konzentrierten Wirkstoffsalze selbst hervorgerufen wird, zurückzuführen.

6. Ungepufferte Pasten von Eosin wirkten in der gleichen Weise wie sauer gepufferte.

7. Es kann angenommen werden, daß der Wirksamkeitsverlust bei höherem pH durch einen Unterschied im Permeationsvermögen von Ionen und Molekülen hervorgerufen wird. Demzufolge können die im sauren Bereich vorhandenen Moleküle in das Plasma eindringen und zur Wirkung kommen, während die Ionen elektroadsorptiv an der Zellwand gespeichert werden.

8. Es wird die Möglichkeit eines „sensibilisierenden Effekts“ eines Ionen-Molekül-Gemisches, welches in bestimmtem pH-Bereich vorliegt, auf die *Avena*-Zellen diskutiert, aber auch als möglich betrachtet, daß das nichtionisierte Molekül für die Hemmungskomponente, das Ion aber für die Förderungskomponente der Konzentrations-Wirkungskurve verantwortlich ist. Hierdurch könnten die höheren Förderungswerte im neutralen bis basischen Bereich erklärt werden.

9. Es wird darauf hingewiesen, daß unbekannte Substanzen im Pastentest nicht nur in ungepufferten, sondern sowohl in sauer als auch basisch gepufferten Pasten geprüft werden sollten.

Literatur

- Akamine, E. K., 1951: Persistence of 2,4-D Toxicity in Hawaiian soils. Bot. Gaz. 112, 312—319.
- Audus, L. J., 1949: Studies on the pH relationship of root growth and its inhibition by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and coumarin. New Phytol. 48, 97—115.
- Bonner, J., 1934: The relation of hydrogenions to the growth rate of the *Avena*-coleoptile. Protoplasma 21, 335.
- Blackman, G. E., and R. C. Robertson-Cunninghame, 1953: The influence of pH on the Phytotoxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to *Lemna minor*. New Phytol. 52, 71.
- Hammer, C. L., E. H. Lucas and H. M. Sell, 1947: The effect of different acidity levels on the herbizidal action of the sodium salt of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Mich. Agric. Exp. Stat. Quart. Bull. 29, 337—342.
- Linser, H., 1938: Zur Methodik der Wuchsstoffbestimmung. Planta 28, 227—265.
- 1954: Die Wuchsstoffwirksamkeit von β -Naphthoxyessigsäure und Indol-3-essigsäure in gepufferten Lanolinpasten verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen. Protoplasma 44, 307—313.
- und O. Kiermayer, 1957: Methoden zur Bestimmung pflanzlicher Wuchsstoffe. S. 90 f. Wien: Springer.
- Mitchell, J. E., R. E. Burris, and A. J. Riker, 1949: Inhibition of respiration in plant tissues by callus stimulating substances and related chemicals. Amer. J. Bot. 36, 368—378.
- Rietsema, J., 1949: Über den Einfluß des pH auf das Wachstum von Koleoptilstücken von *Avena*. Proc. kon. nederl. Akad. Wetensch. 52, 1039—1050.
- Simon, E. W., 1950: Effect of pH on the biological activity of weak acids bases. Nature 166, 343—344.
- Söding, H., 1952: Die Wuchsstofflehre. Stuttgart: Thieme.
- Strügger, S., 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer.
- Santen, A. M. van, 1938: Influence of hydrogenion concentration on the growth rate of *Avena-coleoptile*. Proc. Roy. Acad. Amsterdam 41, 515.

Developmental Mechanics of Fucaceous Algae XII. Further Studies on the Blister Formation in Furoid Eggs¹

By

Singo Nakazawa

Biology Department, Yamagata University, Yamagata, Japan

With 1 Figure

(Received July 14, 1958)

It is known that when *Coccophora*, *Fucus*, and *Sargassum* eggs are immersed in zinc chloride solution blister formation does occur on the surface of those eggs (Nakazawa 1957). As to this phenomenon it has been considered that the blisters are the extruded cytoplasm through small holes of the plasma membrane made by zinc chloride solution. A more detailed account is presented in this paper.

The material fucoids were *Coccophora Langsdorffii* collected at Asamushi, *Fucus evanescens* collected at Muroran, and *Sargassum confusum* collected at Asamushi. In *Coccophora* and *Sargassum*, eggs were discharged in glass vessels and were fertilized artificially, and in *Fucus*, the eggs were liberated after being naturally fertilized in the receptacle cultured in glass vessels, as the former two were dioecious but the latter was hermaphrodite. The agents tested for inducing blister formation were chromic acid, cobalt chloride, copper sulphate, potassium bromide, zinc chloride, zinc sulphate, and urea. All of these were used after being dissolved in water at various densities. Water solutions of brilliant green, neutral red, toluidin blue and alcohol solution of Sudan III were applied in staining blisters.

Among the various agents, only zinc chloride was effective for the blister formation, and it is specially noteworthy that zinc sulphate was invalid. The relation between the density of zinc chloride and the time required for the blister formation in fertilized eggs of each furoid is indicated in Table 1. The egg cytoplasm of these furoid eggs can be stained with some dyes quite well (Nakazawa 1953). When eggs stained vitally

¹ Aided by a grant from the Saito Gratitude Foundation, Sendai.

with brilliant green, neutral red, or with toluidin blue are immersed in zinc chloride, green, red, or blue blisters are formed corresponding to the dye. When the egg is centrifuged at 1500 times gravity for 30 minutes, the intracellular materials are clearly stratified (Nakazawa 1957). A notable occurrence which takes place, when the centrifuged egg is immersed in zinc chloride is that a young yellow giant blister appears at the centripetal end

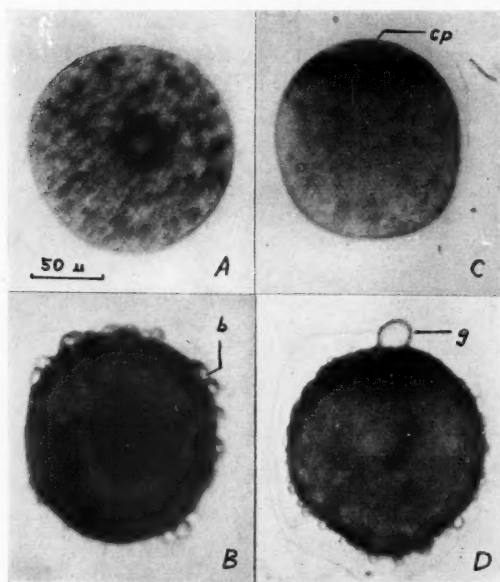


Fig. 1. Blister formation in *Coccophora* eggs. A normal egg. B centrifuged egg. C blister formation in a normal egg. D the same in a centrifuged egg, b, normal blister; cp, centripetal end; g, giant blister appeared at the centripetal end.

where the oil drops were gathered by the centrifugation, while the smaller normal blisters appear over the other part (Fig. 1 C, D). The centrifuging experiment was carried out in *Coccophora* as well as in *Sargassum* but not in *Fucus*. When distilled water or normal sea water is added, the normal blisters are detracted gradually sooner or later, but the giant blister remains. The giant blister is stained pink with alcohol solution of Sudan III, but the normal blister is not. When alcohol of the higher density, say 70 per cent, is added, the giant blister is dissolved but the normal blister is not. The normal blisters, when they are kept in a natural state, are gradually dissolved in the surrounding medium within two or three hours, but the giant blister remains much longer.

After fertilization, the egg is transformed into an ovate form, cellulose deposits gradually and the egg form is stabilized, i. e. the polarity axis is determined. When the egg at this stage is immersed in the same zinc chloride solution, plasmolysis does occur; that is, the protoplasm is separated from the cell wall, and the blisters do appear in the space intervening between the cell wall and the plasma membrane. At a later stage than the first cleavage, the blister formation becomes less remarkable, and finally, it does not occur in the young embryo. Before fertilization it occurs just as plainly as in the fertilized egg. But it does not occur when

the yet undischarged eggs are taken out of the conceptacle by cutting receptacle and immersed in zinc chloride of the same density.

Based on the above experiments, it seems that the blister formation with zinc chloride is a common phenomenon in fucoid eggs. Its mechanism is considered to be that the plasma membrane is destroyed with zinc chloride at many points, so that many small holes are bored on the surface, and as a result, the hyaline plasm is extruded through those holes. That the blister is composed of the hyaline plasm is verified from three points. Firstly, the blister is colourless and contains no microsome. Secondly, coloured blisters do appear when the egg is stained by being immersed in zinc chloride,

Table 1. *The relation between the density of zinc chloride and the time required for the blister formation in fucoid eggs.*

Density of zinc chloride in per cent	Time required for blister formation in seconds		
	<i>Coccophora</i>	<i>Fucus</i>	<i>Sargassum</i>
60	30 ~ 36	30 ~ 42	30 ~ 36
50	50 ~ 60	50 ~ 60	50 ~ 90
25	300 ~ 360	360 ~ 420	360 ~ 420
15	∞ ¹	∞	∞
10	∞	∞	∞
5	∞	∞	∞
0	∞	∞	∞

¹ ∞ indicates non-occurrence of the blister formation within an hour.

and that their colour corresponds to the dye with which the egg was stained previously. Thirdly, the appearance of an oily blister at the centripetal end where the oil cap was stratified, but normal blisters in the other region when the centrifuged egg is immersed in zinc chloride, is a strong indication that the normal blister is an extrusion of the hyaline plasm.

Summary

(1) Blister formation occurs when eggs of *Coccophora Langsdorfii*, *Fucus evanescens*, and *Sargassum confusum* are immersed in zinc chloride solution at a density higher than 25 per cent.

(2) When the egg is stained vitally with brilliant green, neutral red, or with toluidin blue, then immersed in zinc chloride, coloured blisters appear, and their colour is the same as that of the stained egg.

(3) A giant oily blister appears at the centripetal end where the oil drops were stratified but normal blisters appear in the other region, when the centrifuged eggs are immersed in zinc chloride.

(4) Normally, the blister, seems to be the extrusion of the hyaline plasm through small holes of the plasma membrane made by zinc chloride.

Literature

- Nakazawa, S., 1953: Vital staining of the plasm in the eggs of *Coccophora* and *Sargassum*. Sci. Rep. Tôhoku Univ., 4th Ser. 20, 89—92.
- 1957: Developmental mechanics of Fucaceous algae VI. A unified theory of the polarity determination in *Coccophora*, *Fucus*, and *Sargassum* eggs. Sci. Rep. Tôhoku Univ., 4th Ser. 23, 119—150.
- 1958: Do VIII. Blister formation in some fucoid eggs. Bot. Mag. (Tokyo) 71, 23—25.

Myelinfiguren im Cytoplasma meristematischer Zellen

Von

Wilhelm Menke

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juli 1958)

Bei der Durchmusterung von Schnitten durch den Vegetationskegel des Sprosses von *Elodea densa* mit Hilfe des Elektronenmikroskopes wurden gelegentlich Gebilde beobachtet, die mit bemerkenswertem Kontrast abgebildet werden. Diese zeigen häufig einen ringförmigen Querschnitt und liegen einzeln oder sich zu mehreren umschließend, im Cytoplasma der Zellen (Abb. 1 und 2). Sie besitzen annähernd Kugelgestalt. Geringere Abweichungen von der Kugelgestalt beruhen teilweise auf einer Deformation der Schnitte beim Schneiden und auf Störungen durch ungleichmäßig fortschreitende Polymerisation des Methacrylates. Doch findet man auch größere Abweichungen, die offenbar keine Artefakte sind (Abb. 3). Schlauchformen beobachtet man seltener. Die fraglichen Gebilde besitzen eine gewisse Ähnlichkeit mit Myelinfiguren und sphäritischen Bildungen, wie man sie im Lichtmikroskop sieht, wenn man Phosphatide in Wasser quellen läßt.

Die Vegetationskegel, von denen die wiedergegebenen Aufnahmen stammen, wurden mit 2,5% neutralisierter wäßriger Formalinlösung, die 0,15 mol Glukose enthielt, fixiert und nach Auswaschen des Formalins durch Wasser mit 1% wäßriger Osmiumtetroxydlösung nachbehandelt. Nach abermaligem Waschen wurde in Äthanol steigender Konzentration übergeführt, wobei das 70% Äthanol nach der Vorschrift von Wohlfarth-Bottermann (1957) 1% Phosphorwolframsäure enthielt. Aus reinem 70%igen Äthanol gelangten die Präparate über 100% Äthanol zur Einbettung in das Methacrylatgemisch.

Bei hinreichender Vergrößerung lassen die Wandungen eine Längsstreifung von großer Regelmäßigkeit erkennen (Abb. 4). Diese besitzt eine Periode von 33 Å mit ± 2 Å als größte Abweichungen. Diese Periode ist kleiner, als man sie für bimolekulare Lipidlamellen erwartet. Die röntgenographisch ermittelten großen Netzebenenabstände in kristallinen Phospha-

tiden betragen nach Finean (1953) bei Zimmertemperatur etwa 50 bis 65 Å. Diese entsprechen ungefähr der doppelten Länge der Molekeln. Geren und Schmitt (1953) ermittelten die Periode in Myelinfiguren aus Acetalphosphatiden elektronenmikroskopisch zu 41 Å. Finean (1953) fand in kristallinen Acetalphosphatiden ebenfalls einen größeren Netzebenenabstand (65 Å). Stoeckenius (1957) gibt für Myelinfiguren im Cytoplasma von Makrophagen eine Periode von 45 bis 50 Å an. Die elektronenmikroskopisch bestimmte Periode in Myelinfiguren sollte jedoch größer sein als die Netzebenenabstände in Kristallen; denn die Myelinfiguren enthalten zwischen den bimolekularen Lamellen Quellungswasser. So entspräche die Periode auf den vorliegenden Aufnahmen eher dem halben Netzebenenabstand der wasserhaltigen Myelinfiguren. Ersatz des Quellungswassers durch Flüssigkeiten, deren Dielektrizitätskonstanten kleiner sind als die des Wassers, führt jedoch zu einer Abnahme der Netzebenenabstände, weil die elektrostatischen Kräfte zwischen den Molekeln größer werden (Menke 1957 a). Doch können die Abstände nicht kleiner werden als die Abstände in Kristallen. Entweder haben also die bimolekularen Lamellen in den Myelinfiguren eine andere Struktur als in den Kristallen¹, oder die Periode wird durch Präparation und Elektronenbestrahlung verkleinert. Man müßte bei der Beurteilung dieser Frage besonders den Einfluß der Fixierung in Betracht ziehen, über den man in diesem Zusammenhang wenig weiß.

Gemäß Überlegungen über das Zustandekommen der Kontraste ist es selbstverständlich, daß diese nicht durch Lipide selbst hervorgerufen werden können (Menke 1957 b, 1958). Auch die Anlagerung einzelner Molekeln des Kontrastierungsmittels an die polaren Gruppen oder die Doppelbindungen der Lipide dürfte kaum einen so starken Kontrast bewirken. Diese Anlagerungen leiten jedoch die Reaktionen ein, welche endlich zur Ablagerung der Schwermetallverbindungen in kolloider Form führen. Sonst wäre die große Regelmäßigkeit der Ablagerungen kaum verständlich. Wenn diese Auffassung vom Kontrastierungsvorgang zu Recht besteht, so ist es nicht sinnvoll, die Breite der dunklen Streifen Molekülgrößen zuzuordnen, wie es häufig geschieht. Gegen eine solche Zuordnung spricht außerdem die triviale geometrische Überlegung, daß die Dicke von Lamellen nur dann richtig wiedergegeben wird, wenn diese sehr exakt senkrecht zur Ebene des Präparates orientiert sind.

Hinzuweisen wäre noch darauf, daß sich Myelinfiguren nicht regelmäßig in den Vegetationskegeln von *Elodea densa* nachweisen lassen. Man kann daher vermuten, daß sie durch eine Wachstumshemmung entstehen oder, daß sie infolge einer Schädigung durch Spaltung von Lipoproteiden gebildet werden. Da in der nächsten Zeit eine eingehendere Untersuchung nicht erfolgen kann, dürfte dieser kurze Hinweis gerechtfertigt sein, obwohl die schwebenden Fragen verhältnismäßig leicht zu klären wären.

¹ In der Ebene der bimolekularen Lamellen ist die Struktur der Myelinfiguren eher mit der Struktur einer Flüssigkeit vergleichbar als mit der eines Kristalls. Die obige Feststellung bezieht sich auf die Ordnung senkrecht zur Lamellenebene.

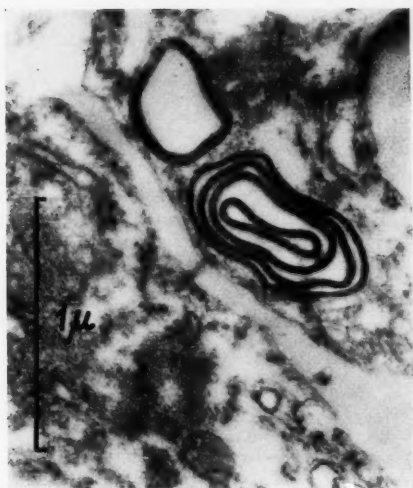


Abb. 1.

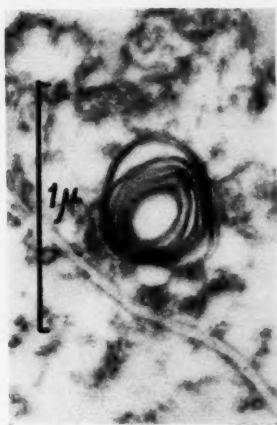


Abb. 2.

Abb. 1, 2 und 3. Schnitte durch Myelinfiguren in meristematischen Zellen von *Elodea densa*.



Abb. 3.

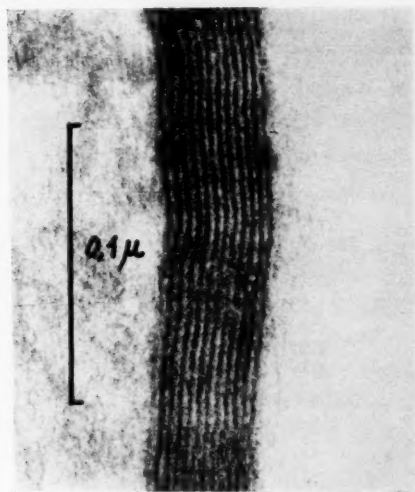


Abb. 4.

Abb. 4. Stärker vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 1.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für ihre Unterstützung meiner Untersuchungen zu Dank verpflichtet. Fräulein Helga Lehmann danke ich für ihre Mitarbeit.

Zusammenfassung

Im Cytoplasma der Vegetationskegel von *Elodea densa* treten gelegentlich Myelinfiguren auf. Die Periode der Längsstreifung, welche bei hinreichend hoher elektronenoptischer Vergrößerung in den Wandungen derselben abgebildet wird, ist kleiner als die großen Netzebenenabstände in Kristallen aus Phosphatiden.

Literatur

- Finean, J. B., 1953: X-Ray diffraction studies on the polymorphism of phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 10, 371—384.
- Geren, B. B., and F. O. Schmitt, 1953: The structure of the nerve sheath in relation to Lipid and to Lipidprotein layer. (Vortragsreferat.) *J. Appl. Physics* 24, 1421.
- Menke, W., 1957 a: Artefakte in elektronenmikroskopischen Präparaten. I. Mitt.: Anisotrope Volumänderungen von Chloroplasten. *Z. Naturforsch.* 12 b, 654—656.
- 1957 b: Artefakte in elektronenmikroskopischen Präparaten. II. Mitt.: Zur Fixierung von Chloroplasten mit Osmiumtetroxyd. *Z. Naturforsch.* 12 b, 656—659.
- 1958: Artefakte in elektronenmikroskopischen Präparaten. IV. Mitt.: Dunkel-felduntersuchungen nach Fixierung mit Osmiumtetroxyd. *Z. Naturforsch.* 13 b, 187—189.
- Stoeckenius, W., 1957: OsO_4 -Fixierung intrazellulärer Myelinfiguren. *Exper. Cell Res.* 13, 410—414.
- Wohlfarth-Bottermann, K. K., 1957: Die Kontrastierung tierischer Zellen und Gewebe im Rahmen ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchungen an ultradünnen Schnitten. *Naturwiss.* 44, 287—288.

Negative Oxidation Reduction Potential as the Limiting Factor for Exogastrulation in Sea Urchins

By

Matilda Moldenhauer Brooks

From the Department of Physiology, University of California, Berkeley, California

(Received August 2, 1958)

The experiments of Herbst (1892—1896) demonstrated the effects of lithium chloride on the development of echinoderm eggs. These have been a source of inspiration for many investigators throughout the years, in endeavoring to explain the causes of this change in growth. Herbst showed that under certain experimental conditions, involving concentration of reagent, time intervals, and state of development of the larva, he was able to produce evagination of the gut of the larva of sea urchins. This change took place in the gastrula stage forming the so-called "exogastrula."

In later times it was shown that many other reagents also produced exogastrula and it appeared as if there was no specificity involved to produce these results since these reagents were not chemically related. They include sodium butyrate, HgCl_2 , CuSO_4 , KCN, lack of Mg, crowding, Neutral red, methylene blue in certain concentrations, auxin, tobacco smoke, X-rays, CO, sucrose, hypo and hypertonic solutions, temperature changes, crowded cultures, sodium azide, pancreatin, structural changes, and others (see Child, 1936). They all produce changes in the development of the larva, showing the same general character and differing only in degree. The change includes an abnormal production of cells in the basal region, a lack of growth of certain mesenchyme cells and their structures, and an extension of the gut outwards instead of inwards in the blastocoel cavity. It is expressed by Child, Rünstrom and others, as producing an extension of endoderm towards the apical pole at the expense of ectoderm.

The whole process of growth and development of living cells has as its fundamental basis the utilization of energy, produced by the activation of the various enzymes in balance with each other. If this balance is upset, resultant changes produce abnormal effects.

The production of energy for the normal growth of cells is dependent upon a definite oxidation-reduction potential. Without the definite energy required, certain chemical reactions in cells do not proceed. As the cell

develops, the potential changes, and the enzyme relations change. At a high positive potential O_2 is activated in greater concentration than at a more negative potential and the rate of respiration is high, decreasing as the potential becomes more negative. These facts have been demonstrated by Barron (1929) and Barron and Hoffman (1950), in experiments showing the relation between the rate of O_2 consumption and the redox potential in certain marine eggs. These experiments demonstrate the interrelation between High rate of O_2 consumption, high positive redox potentials and high energy levels.

The growth pattern of a cell depends upon the activity of the enzymes and the rate of electron transference and hydrogen transport of the reversible oxidases and hydrogenases of the respiratory system. Table 1 shows

Table 1. *Oxidation reduction potentials of the Enzymes of the respiratory system at pH 7.0*
(After Chance and Williams, 1956.)

Couple	E_0 in millivolts
Oxygen	+ 815
Cytochrome a	+ 290
Cytochrome c	+ 260
Cytochrome b	0 to - 040
Succinic dehydrogenase	015 at pH 6.9
Flavoprotein	- 060
Pyridine nucleotide	- 320

the relation on the redox scale, of these sets of enzymes to each other at their respective redox potentials (E_0 values). Any reagent which changes the normal ratio of oxidants to reductants at any place in the respiratory chain changes the redox potential. This change is then reflected in the type of growth of the cell affected.

The cytochrome-oxidase system of the respiratory enzymes is affected by any reagent which produces a negative potential. An example of this is the combination of CO with the iron porphyrins of the cytochrome system, preventing the electron exchange and the activation of O_2 , or the inhibition of succinic dehydrogenase system with subsequent failure of hydrogen transport. Some reagents produce such a negative potential that only reductants can exist, and the cell changes into an abnormal state. Some reagents raise the potential to such a positive value, that the dehydrogenases are unable to form reductants with subsequent inhibition of hydrogen transport.

The subject of this paper deals mainly with the production of exogastrula and the explanation for this change in the development of the sea urchin as attributed to the negative potential as the common factor responsible in the case of lithium and other apparently unrelated chemical or physical changes.

The whole problem devolves upon the fundamental concept that the

different processes in the normal cell are performed at different energy levels, or at different redox potentials. In normal cells there is a delicate balance which permits the formation of the different organs. When this balance is upset, the various enzyme systems are thrown out of equilibrium and react at the abnormal energy level. When therefore, a lower redox potential is produced, as indicated by the effects of lithium chloride in sea urchin larvae, the basal end produces only those cells which can be formed under the new conditions, and those organs which require a more positive potential are not produced. Child (1935, 1936) has demonstrated that there is an oxidation gradient in the larva of certain marine eggs. The apical or animal end or ectodermal region has a higher redox potential than the basal or vegetal end or endoderm. He showed these differences in a number of experiments using certain redox indicators and the indophenol blue reaction. By noting the speed of oxidation or reduction of the reduced or oxidized indicators, he found that the animal region had a more positive redox potential than the vegetal end. In general the results have similar conclusions with a number of species.

He also found that there is a differential gradient in the blastula stage of the larva so that the interior region of the basal endoderm where the secondary mesenchyme cells are formed, has a more positive potential normally than the exterior region. This observation is of primary importance in that it explains the reasons for the formation of exogastrula. When this differential between the interior cells and the exterior is eliminated by certain reagents, producing a negative potential in the interior, the pattern of growth is changed. This change is discussed under the section "Blastula stage."

Runnström (1928) has advanced the theory of an "animal" gradient in the larva decreasing basipetally, and a vegetal gradient decreasing acropetally. He suggested that lithium salts increase the vegetal gradient towards the animal pole and thereby increase endodermization.

Horstadius (1935) has demonstrated that the implantation of micromeres into the animal region of the larva produced extensions of the vegetative gradient, obtaining vegetal characteristics such as spine formation and beginning mouth formation in the blastula. He also showed that when the two halves of the larva were completely separated, the vegetal half produced characteristics in growth which had an extraordinary similarity to the forms produced by lithium. It was also found that an increase in the amount of micromere material implanted in the animal half gave the same effect as an increase in lithium concentration.

Von Übisch (1929) tried to induce the growth of vegetal characteristics by subjecting animal halves to lithium and thought he had obtained the desired result.

The various degrees of endodermization depend upon the redox potential of the reagent used. Child (1936) found that janus green which has a very negative E_0 produced a thick-walled basal region suggesting complete endodermization. On the other hand, methylene blue, which has a more positive E_0 than janus green or neutral red, gives a lesser degree of change.

Low concentrations of either of these reagents under certain experimental conditions produce exogastrula. See Table 2 for comparison of redox indicators.

Lindahl and Holter (1938) have criticised Child's conclusions that there exists an oxidation-reduction gradient from the apical or animal end of the larva to the basal or vegetal end. They determined the O_2 consumption of the separate halves of the larva, i.e., macromeres and micro-

Table 2. *Oxidation reduction potentials of Alkali Metal elements in Aqueous Solutions measured in volts.*
(After Eucken, Jette and LaMer¹)

Element	Potential
Li/Li+	-2.957
K/K+	-2.922
Ca/Ca+	-2.87
Na/Na+	-2.712

meres in *Paracentrotus lividus* by means of the Cartesian divers method. They state that there was no difference in the rate of O_2 consumption of the separated halves, and that the sum of the O_2 consumption of the separated halves equals that of the intact larva.

They also used several reagents including lithium chloride, KCN and pyocyanin on the separated halves and on the whole larva, and stated that there was no difference in the rate of O_2 consumption between the two halves. Since there is a direct relation between rate of O_2 consumption and redox potential, they concluded that the existence of a redox gradient along the animal-vegetal axis has not been established.

In several experiments illustrated in the tables, there is a slightly lower O_2 consumption produced by the vegetal halves, which the experimenters conclude are within the limits of probable error. In biological experiments it is generally conceded that an error within the limits of 10% arrived at statistically is adequate in forming conclusions. However in experiments involving changes in redox potential, only a minute fraction of the molecular oxygen is activated and only minute changes in redox potential in cells occur. The difference in interpretation of the results of these two experimenters appear to be due to the relative sensitivity of the two methods used.

In the case of the Cartesian divers method, according to Lindstrom-Lang (1937) the accuracy of this method is within the limits of

¹ The difference in the signs attributed to these elements here as compared with the signs in other publications is due to measurement of the potential of the metal (Hildebrand and Powell) which is positive as compared to the measurements of the aqueous solution which is negative; this is unfortunate as it causes confusion.

Differences in redox potential between

Lithium and sodium245 volts
Potassium and sodium210 volts

.002 c.mm. On the other hand, color changes involve differences in wave lengths and fractions thereof, such as are measured by Newton's rings in the visible range from .0004 to .0008 μ , which are easily distinguished by the naked eye. These differences are much more sensitive than the Cartesian divers method and less difficult to obtain.

In this connection, the experiments of Norris and Rosene (1955) show that there is a difference in redox potential between the apical end and the basal end of the onion root with the more positive potential at the apical end.

Ranzi and Falkenheim (1957) using certain redox indicators including brilliant cresyl violet, janus green and toluidine blue showed that these dyes were more quickly reduced at the animal than at the vegetal pole. This is in agreement with the results of Child (1936). They concluded that lithium produces a dispersion of the protoplasmic colloids causing a rise in the redox potential and an increase in vegetal precipitation.

The experiments of Brooks (1956) were done with the object in view to determine whether the various reagents causing endodermization in various degrees, could be classified under a single heading of changes in redox potential. It was found that those in the negative region of the redox scale produced results similar to a wide variety of those resembling the lithium larvae, with intermediate forms at intermediate potentials.

The experiments of Von Übisch (1925) are interesting in this connection. He placed apical halves of the larva in lithium solutions and found that the ectoderm may be changed into endoderm and gastrulate.

If ectoderm and endoderm are subject to such variations, it is further evidence that a common principle operates in both cases, namely the state of the redox potential.

There is an optimal effect below or above which the organism does not respond. Barron (1929) showed this in his experiments on redox indicators and their effect on O_2 consumption. As the potential became more positive, the rate of O_2 consumption increased up to a certain limit, after which it decreased. When the ratio of oxidants to reductants is 50/50, there is a complete exchange of the two species and therefore an optimal effect, because of equal concentrations of each species. If this ratio is changed in either direction, so that a preponderance of one exceeds the other, the reaction is limited to the concentration of the lesser species, thereby lowering the energy level.

The effect of such changes is also illustrated in the case of certain sea urchins which have a low rate of respiration in the unfertilized state and a high rate after fertilization, showing that the redox potential becomes more positive on fertilization. Or in the case of cyanide which produces a negative potential, there is no effect on the rate of O_2 consumption in unfertilized eggs, because the potential of the egg is in the negative range, but after fertilization, the respiration is inhibited.

A more recent study is that of Harvey and Williams (1958) on the change in the heart beat of the *Cecropia* moth at certain stages of

development. The pupal heart beat is not affected by cyanide nor by the absence of O_2 , whereas later in the development it is. When CO is used at certain stages to stop the heart beat, it can be restored by subjecting it to the same wave length which corresponds to the absorption of that wave length by cytochrome oxidase. This illustrates that the energy level produced by the wave length activating cytochrome oxidase is raised, or that the redox potential is changed to normal by restoring the correct ratio of oxidants to reductants in the positive region of the redox scale.

In both cases above, a definite potential is needed to produce the reversible exchange of electrons of the respiratory cycle so that the correct ratio of oxidants to reductants will permit normal respiration.

In normal cells the various enzyme systems are poised with respect to their ratios of oxidants and reductants at a definitive potential. There is a constant chain of reactions by which electrons and/or H are reversibly transferred, with activated O_2 at the highest oxidation level and the succinic dehydrogenase-flavoproteins-pyridine nucleotides at the lower level.

Any reagent which reduces or inhibits one step in the chain of reactions, lowers the energy level and produces a more negative redox potential, resulting in an abnormal rate of respiration and abnormal growth. The enzyme systems are thrown out of equilibrium and can act only at the reduced energy level.

It is for this reason that the various reagents not chemically related and producing exogastrula or degrees thereof, can be classified under one heading, namely the production of a more negative potential.

It will be shown in the latter sections that such changes are produced by these reagents at different steps in the respiratory chain, inhibiting one of the enzyme systems and thereby diminishing the necessary energy to produce certain organs. Such an example is seen in the experiments of Dan and Okazaki (1956) in which the energy level was too low to produce certain endodermal growth patterns as is discussed later.

The following reagents are discussed and their effects on specific enzyme systems illustrate different regions of inhibition in the respiratory chain, so that vegetalization and exogastrulation occurs.

- Lithium chloride
- Ca-low sea water
- KCl
- CO and CN
- Sucrose
- Hypo- and hypertonic solutions
- Pancreatin
- Crowded cultures
- Sodium azide
- Certain oxidation-reduction indicators
- Sulphate
- Two reagents balancing each other
- Mitochondria and pyridine nucleotides
- Succinic dehydrogenase.

The Blastula Stage

As the larva develops, changes in redox potential occur. This has already been illustrated in the experiments on rate of respiration of fertilized and unfertilized eggs of *Arbacia*. Preliminary experiments also of Brooks (1947) on eggs and larvae of *Arbacia* en masse by means of an electrometer are subjected to the usual criticism involving presence of residual sea water, crowding, surface effects as compared with internal measurements, sensitivity of the instrument and others. Nevertheless results show that the redox potential changes and is in agreement with other experimental procedures. Observations with indicators which give colors are more sensitive and accurate, so that differentiation at various parts of the larva can give an indication of the redox potential of a specific area.

In normal development the larva undergoes certain changes at the blastula stage. Herbst (1897) found that the sulphate radical is necessary for the development of primary mesenchyme. Lithium is most effective at the 2-4 cell stage. Gustafson (1951) found that the activity of succinic-dehydrogenase is constant up to the mesenchyme-blastula stage, and that there is a rise in activity at that period.

As gastrula approaches, the basal region, mesenchyme and endoderm undergo a change in condition which is shown by a rather intense activation, indicated by marked increase in rate of dye reduction according to Child (1940). The secondary mesenchyme cells which form the endodermal plate and from which the pseudopodia grow become colored more quickly than the cells on the external layer of the basal endoderm. This indicates that the mesenchyme cells have acquired a more positive redox potential than formerly (Child, 1953) and is significant in the interpretation of the effect of lithium. When Child exposed larvae under certain experimental conditions to Lithium, the redox pattern was reversed, so that there appeared a decrease in rate of oxidation of the indicators used in this region of the endodermal plate inside the blastula. In short the polarity was reversed by lithium, endodermization was produced and the archenteron was not able to invaginate, but grew outwards producing exogastrula.

If larvae are returned to sea water before it is too late, the normal potential of the sea water can change the polarity to some extent so that recovery in some measure occurs. However, in the case of the so-called "ball" formation representing the entire embryo as a rounded larva, it is evident that the development of any morphologically distinct changes between ectoderm and endoderm are completely inhibited.

The effect produced by changing the basic pattern of development with respect to ectoderm or endoderm by altering the oxidation gradient which is present in the embryo, gives a definite clue as to the cause of these changes. There is produced an obliteration of the physiological gradient so that the ectoderm is apparently changed into endoderm.

Since it requires a higher energy level to produce the archenteron and pseudopodia, it is demonstrated that a change to a lower energy level or

negative redox potential, will result in the inhibition of those growth patterns which normally form at a higher level.

The ability to change the direction of growth in embryonic cells seems to be a universal law, if factors are added at a stage before differentiation takes place. This has been illustrated in cells as highly evolved as nerve cells of certain mammals as shown by Hamburger (1957).

Lithium Chloride

Table 2 shows that there is a difference in redox potential between the alkali metal ions of sea water and that K is the most negative and Ca the most positive. Since NaCl is the chief constituent of sea water with minor concentrations of K, Mg and Ca, it can be readily seen that the addition of a chemical in sufficient concentration, having a lower redox potential and penetrating by virtue of ion exchange, would produce a more negative redox potential than normal in the cell. The potential produced is a function of the concentration of the lithium ions that penetrate, as indicated by the effects produced on the development of the larva.

The lithium ion has certain characteristics which differ from those of the other alkali metal ions. It is the smallest in size, the most soluble, and has the highest energy of hydration (Hildebrand and Powell, 1957). It has a rapid rate of penetration into the cell, and the most negative redox potential of the series.

The effect upon growth of the cell, because of difference in redox potential of these alkali metal ions, has not been considered in the past as an explanation of the effects of lithium chloride or potassium chloride. Both of these are more negative in potential than the remaining ions of the series. Nor has the effect of lithium on the specific enzymes been considered in lowering the potential of the cell. It reduces to a greater extent than K or Na the solubility of succinic acid which occurs in one of the main steps in the respiratory cycle (Eucken, Jette and LaMer). By inhibiting the transfer of hydrogen and diminishing the rate of electron exchange in one of the respiratory links, the whole process of metabolism is affected as the reductants accumulate, thereby causing the redox potential to become more negative. It decreases the rate of respiration of whole fertilized eggs (Runnström 1929). If KCl is added to the solution of lithium chloride in certain concentrations, it counteracts the effects of lithium to a degree and raises the rate of respiration (Lindahl 1940). This would be expected since the K ion has a more positive potential than that of the Li ion and would raise the potential.

Runnström (1933) showed that when lithium chloride is added to cytolized eggs placed in solutions of methylene blue, the time of reducing the color is shortened. This again shows that lithium produces a negative potential, and in this case, lower than that of the cytolized eggs.

Further experiments showing the effects of lithium chloride in connection with another reagent are described in the section of "Effects of two reagents used simultaneously."

Ca-low seawater

It has been found by various investigators that sea water containing little or no calcium, produces vegetalization of sea urchin larvae. When larvae are grown in normal sea water, they are adapted to the concentrations of the respective alkali metal salts of the normal environment. When Ca is decreased or omitted from sea water in which the larva are grown, the ionic equilibrium between the external solution and the interior of the larva is out of balance. Therefore an ionic exchange will occur, in which Ca ions will diffuse outwards from the cells in accordance with the diffusion gradient.

McCutcheon and Lucke (1928) have shown that the rate of swelling of certain sea urchin eggs is decreased in the presence of Ca. In the absence of Ca, intake of water will occur. As the egg swells, the ionic balance must be maintained. The K ion has the highest rate of mobility of the alkali metal ions of sea water, entering. Since no oppositely charged ion can accompany an ion through any single selectively permeable area, the electrical neutrality will be maintained by counter-diffusion of other similarly charged ions in amounts electrically equivalent to the ion leaving the cell (Brooks and Brooks 1941).

In addition, since Ca produces a more positive redox potential than K, its elimination would lower the potential. Calcium deficiency in the cell changes the activity of certain enzymes, especially that of succinic dehydrogenase which is activated by Ca ions (Ahlgren 1923, Axelrod, Potter, and Elvehjen 1942). Since this enzyme is an important constituent of the respiratory chain, its partial inactivation would change the rate of biochemical reactions of the whole metabolic system.

It may also be added that agents which inhibit respiration also inhibit animalization of the embryo. Absence of calcium in sea water increases this inhibition (Lindhahl 1936).

The vegetalization produced by Ca-free sea water can be counteracted by NaSCN which produces a positive potential, completely animalizing the larva (Lindhahl 1933).

The above experiments are further evidence that a negative redox potential is the cause of the vegetalization in Ca-low sea water.

Results with KCl

K has the most negative redox potential of any of the alkali metal ions normally found in sea water. Therefore when higher concentrations of KCl are added to sea water, the K ion diffuses into the cells to equalize differences in concentrations between the inside and outside of the cells. In this way, the redox potential will become more negative in the cells, producing the development of the endodermal area, inhibition of the ectodermal area and either complete or partial evagination.

Runnström (1928) found that KCl counteracts the morphological effects of lithium chloride. Lindahl (1936) also showed that the addition

of KCl decreases the inhibiting effects of lithium on the rate of respiration of sea urchin larvae. These results are explained by differences in potential produced by the two reagents. KCl produces a higher potential than lithium and would therefore raise the potential towards the normal.

When KCl is used with normal larvae, the endoderm is enlarged. Since the salt balance between the alkali metal ions is upset, by the addition of a higher concentration of KCl, a more negative potential results with the consequent effects on the endoderm. See the section on Hypertonic solutions.

An interesting correlation with reference to another problem, can be used here to show the effect of KCl in producing a negative potential. Beutner (1957) using Osterhout's experiments on *Nitella* states that the electric potential difference of the protoplasm of this plant is positive on the outside but becomes negative when more concentrated solutions of KCl were used. However the conducting surface can be restored by enzymatic oxidation.

Difference in action of CO and HCN

CO combines with iron-containing enzymes changing them to an irreversible compound, stopping electron transfer which takes place normally in the positive region of the respiratory chain.

Table 5. Oxidation Reduction Potentials of Dyes at pH 7.0.
(After W. M. Clark, 1928.)

Dye	E ₀
Meta brom phenol indophenol	+ .2475
2-6 dibromophenol indophenol	+ .2184
O-cresol indophenol	+ .1947
Guaiacol indophenol	+ .05
Methylene blue	+ .011
K-indigo tetra sulphonate	— .046
K-indigo mono sulphonate	— .159
Janus green (blue to red) at pH 7.5	— .035
Same (red to colorless)	— .275
Neutral red	— .320

KCN produces a negative potential so that no oxidants of the reversible enzyme systems can be produced and only reductants are formed.

Both of these reagents produce the same morphological effect by different means when larvae of sea urchins are subjected to them. The end result is the same—namely reduction of the rate of O₂ consumption, or complete inhibition, and accumulation of reductants.

If the redox potential is already negative, KCN will have no effect on the rate of respiration, as is the case in unfertilized *Arbacia* eggs. It has been shown by Brooks (1942) in preliminary experiments that certain echinoderms changes their redox potential to a positive value upon fertilization. If at this time the larva is subjected to certain concentrations of KCN, the potential becomes negative, the rate of respiration is inhibited and development stops.

Barnard (1933) showed that the addition of cyanide to the hemoglobin-methemoglobin system caused a shift in the potential to a negative region, indicating that the oxidant was removed from participation in the system (see Table 4).

In the same way, when the ironporphyrin enzymes of the sea urchin larvae are subjected to the action of cyanide, the negative potential pro-

Table 4. *Oxydation Reduction Potentials of Reagents at pH 7.0.*
(From Brooks and Brooks, 1941.)

Reagent	E_0
Cysteine-cystine	-.222
Pyocyanine	-.054
KCN (After Barnard, 1933)	-.1737 to -.3090
Glucose at pH 7.5	-.198

duced will inhibit the production of oxidants and stop the respiratory activity.

The experiments of Runnström (1933) showed that the vegetalization produced by weak lithium concentrations became more pronounced in a gas mixture of 95% CO and 5% O₂ in darkness. In this case the lithium concentration is not sufficient to produce a potential negative enough for a complete effect. However, the CO inactivates the oxygen-activating enzymes so that only reductants accumulate and the potential becomes more negative as the ratio over oxidants increases, thereby producing more pronounced vegetalization.

Lindahl (1936) found that the O₂ consumption decreases as the concentration of lithium increases, showing that there is a relation between concentration of reagent and effect. Lindahl also found vegetalization produced by weak lithium concentrations was more pronounced when KCN or anaerobic conditions were used. All these results can be explained on the basis of changes to a more negative redox potential, the degree of change depending upon the concentration of the reagents used.

A great deal has been written about cyanide-sensitive and cyanide-insensitive enzymes. The results with methylene blue and Cyanide certainly show that the redox potential is the limiting factor rather than a difference in the species of enzyme. This has been shown above in the experiments with cyanide on unfertilized and fertilized sea urchin eggs, the difference consisting in the state of the redox potential.

Sucrose

Moore (1939) used the disaccharides in experiments with *Dendraster excentricus* in endeavoring to explain the causes underlying invagination and exogastrulation. He came to the conclusion that osmotic pressure was the answer. He also concluded that the forces initiating the invagination of the gut are in the area of the endodermal plate. This area is also believed by others to be the seat of beginning gut information.

Child (1953) has demonstrated certain changes in redox potential at the beginning of endodermal formation and gastrulation in which this region becomes more positive in redox potential. This is described in more detail in the section on the blastula stage.

Dan and Okazaki (1956) have used sucrose in sea water in which larvae of *Mespilia globulus* and *Clypeaster japonicus* were grown. They found lack of development of the pseudopodia and exogastrula.

It is interesting to trace the cause of this development to a change in potential produced by sucrose. Sucrose, per se, is not a reducing agent. However when penetrating living cells it is acted upon by certain enzymes including animal sucrase and the phosphatases always present in all living cells. It becomes hydrolyzed and split into its constituent groups, one of which is glucose (Sumner and Somers 1943). Glucose is a reducing agent and as such can be considered the active principle in changing the redox potential of the larva to a more negative value. For this reason it has similar effects as those of lithium and other reducing agents. Since energy levels depend upon the redox potential, it is evident that the negative potential prevents the growth of the pseudopodia and allows the endodermal cells to grow outwards as the line of least resistance into the sea water (see Table 4).

Hypotonic and hypertonic solutions

When a solution is diluted with water, the activity coefficients of the salts are reduced. When larvae are placed in diluted sea water, there is an exosmosis of salts out of the cells and an entrance of water into the larvae to equalize the concentration gradient. This changes the total relationship of the various metabolic enzymes. These osmotic changes in either hypo or hypertonic solutions affect the water concentration in the cell, thus involving the factor of permeability (Brooks and Brooks 1941).

The effect of hypotonic sea water on the production of exogastrula can be placed in the same category as that under the heading of Ca-low sea water. There is a change in the permeability of the egg or larva produced by the intake of water. This is accompanied by the re-arrangement of the ions inside with respect to those outside. As the egg or larva swells in hypotonic solutions, the dilution factor produces profound changes. The equilibrium status of the various electrolytes in the egg is changed, the chemical equivalents for the production of normal metabolism are altered and the activity coefficients rearranged in an abnormal state. This results in a lowering of the energy level, lowering the oxidation state and producing a more negative redox potential.

By way of comparison with marine bacteria, Johnson (1947) states that complex changes take place in the whole organization of the cell in hypotonic solutions; these changes produce loss of luminescence, lower O_2 consumption and other abnormal reactions. O_2 consumption and lumin-

escence are definitely linked to redox potentials, so that a lowering of the rate of O_2 consumption or loss of luminescence can be interpreted as a lowering of the energy level or the production of a negative potential.

The same effects take place in hypertonic solutions according to Johnson. When neutral salts such as NaCl or $CaCl_2$ are added to sea water in concentrations larger than normal, there is a change in the activity coefficients of the ions which results in a decrease of the electromotive force, depending upon the concentration of salts used. The "salting out" effect of ions upon ions is superimposed upon the primary electrical attractions exerted between the ions (Daniel, Matthews, and Williams). This effect increases with increase in concentration, and results in the lowering of the energy level, affecting the state of oxidation reduction potential of the enzymes controlling growth and metabolism.

It may also be noted that in hypertonic solutions, a concentration gradient is produced to equalize the difference in concentration of the ions inside and outside. The K ion has the highest rate of mobility of the alkali metal ions. Since K is the most negative on the redox potential scale, it would have a negative effect on the redox potential of the larva.

Table 5. *Showing changes in oxydation reduction Potentials of hypertonic sea water.*

(After Brooks, 1946.)

Sea water plus reagent	E_h	rH
Sea water (Carmel Bay, California) at pH 8.1033	17.1
50 cc. sea water, 10 cc. $2\frac{1}{2}$ M NaCl, at pH 8.0018	16.6
50 cc. sea water, $7\frac{1}{2}$ cc. $2\frac{1}{2}$ M $CaCl_2$, at pH 6.2074	14.7

Brooks (1942) also found that the redox potential of sea water containing certain higher concentrations than normal of neutral salts was determined by means of the Beckmann E_h meter in preliminary experiments. The results show a more negative potential upon the addition of the salts indicated (see Table 5).

These experiments are further evidence that the lowering of the redox potential is the factor for the production of exogastrula.

Pancreatin

Dan and Okazaki (1956) have used pancreatin to produce exogastrula. Pancreatin preparations contain the enzymes of the pancreas, such as trypsin, amylase and lipase. There is no indication of the state of purity of the product which was used in these experiments, but from the results obtained, it probably contains a number of proteolytic enzymes in different proportions. Lipase, for example, is inhibited by ferric, cupric and mercuric ions and activated by KCN, Na sulfide, cysteine to name a few (Sumner and Somers). This indicates that its activity is in the negative region of the redox scale. These compounds require reducing agents for their activity (Neurath and Dixon 1957). They contain the SH groups and are active in the negative region of the redox scale.

In the case of trypsin, Northrop states that there is no combination between enzyme and substrate and that the reaction takes place with the ionized part of the substrate. It is a proteinase with its specificity on anions and hydrolyzes the substrate.

Many proteolytic enzymes are activated by HCN and the sulfhydryl compounds, and are regarded as a reductant in the oxidation reduction theory (Bergman 1942).

In correlating these results with previous explanations for exogastrulation, the same relationship, involving the effect of a lowered redox potential on the endodermal plate is shown as described in the section on the blastula stage. The conclusion is therefore that in this case also, a negative potential is responsible for the evagination of the archenteron.

Crowded Cultures

In crowded cultures the lack of sufficient O_2 interferes with the proper activation of the respiratory enzymes. There is an accumulation of CO_2 and reductants originating from the reduced activity of the cytochrome-oxidase systems. The higher concentration of reductants lowers the redox potential to a more negative value. The larvae therefore produce forms resembling the exogastrula in various degrees through the inability of the ectoderm to grow normally and through the lowered energy level produced by the negative redox potential.

Sodium Azide

Sodium azide has a specific effect as an inhibitor of heavy-metal catalysts, preventing the activity of the cytochrome system (Pease 1942). It is a reducing agent and as such lowers the redox potential by an over production of reductants which are prevented from becoming oxidized.

The Oxidation Reduction Indicators

Experiments undertaken by Brooks (1956) to show directly with indicators at definite redox potentials, the effects of the specific redox potential on growth and development of the sea urchin larva, were made (see Table 3). It was found that those indicators at a negative potential increased endodermal development, the change depending upon the potential of the indicator. The indophenol dyes, whose E_0 is in the positive region of the scale, developed the apical region, whereas the monosulphonate indicators, whose E_0 is in the negative region of the scale produced exogastrula resembling those produced by lithium. Monosulphonate is the most negative in potential of the sulphonate dyes. The results with neutral red and janus green were a complete endodermization of the ectoderm in some cases and a slight evagination in others. The E_0 of these indicators are in the lower region of the negative scale and would be expected to activate the endodermal tissue. Intermediate forms were produced by the dyes in the intermediate region of the scale.

The importance of a proper redox potential for normal respiration is illustrated in the experiments by Brooks (1932) in which methylene blue was used to counteract the effects of either KCN or CO (Brooks 1933) poisoning in animals and humans. Methylene blue poises the redox potential at approximate neutrality on the redox scale. It therefore counteracts the effect of KCN which produces a negative potential as previously stated, and of CO which combines with hemoglobin, thereby preventing the activation of O_2 . It acts as a reversible electromotively active H acceptor in the case of the two inhibitors at the succinatefumarate enzyme system level. It illustrates the importance of the appropriate redox potential for normal metabolism.

Sulphate

If eggs are placed for certain definite periods of time in SO_4 -free sea water they become ciliated blastulae (Lindahl 1936) and the vegetal or endodermal part does not develop. While inorganic sulphates are not ingested by higher animals, they are important to the normal development of marine species (Fromageot 1947). Herbst (1897) demonstrated that SO_4 is necessary for normal development in the early stages.

If lithium is added to SO_4 -free sea water, the morphological effects are more or less counterbalanced. One can conclude that the negative effect produced by lithium is made more positive when SO_4 is absent. It is evident that the presence of SO_4 in sea water lowers the redox potential by lowering the ratio of oxidants to reductants. The SO_4 radical is probably linked with the SH groups, cysteine-cystine, glutathione system, which have an E_0 in the negative region of the redox scale. Since the endoderm has a more negative potential than the apical region, it is probable that the SH groups are more active in the basal region during development.

Lindahl (1936) showed that isolated animal halves are not influenced by lack of SO_4 whereas isolated vegetal halves are injured. The fact that the ectoderm develops animalization in an SO_4 -free solution indicates that SO_4 produces a negative potential. Since the vegetal end of the larva has a lower redox potential than the animal half, the absence of the sulphur radical appears to block the activity of certain SH groups necessary for the development of this part of the marine larva. This group has its E_0 in the negative region of the redox scale. Its absence would produce a more positive redox potential. This shows the effects of redox potential on growth.

Effects of two reagents used simultaneously

When two reagents are used together, the result will depend upon the respective redox potential of each reagent. If one produces a negative potential and the other a positive one, the result will be a normal reaction, manifested either by a normal rate of respiration or a normal growth.

If both produce a negative potential, the result will be the same as if one was being used, unless they differ in the degree of negativity. In this case they will balance the result at a level consistent with the lower potential, but the results will depend upon the respective concentration of each reagent.

The following examples will illustrate this.

Pyocyanin produces a positive potential in sea urchin eggs and larvae and therefore counteracts any negative potential. It has been used by various investigators in this connection because it increases the rate of O_2 consumption which means that the potential becomes positive. When pyocyanin is added to larvae subjected to lithium, normal or near normal rate of O_2 consumption occurs (Runnström 1933) and the development is normal, illustrating the counteraction of the positive potential of pyocyanin against the negative produce by lithium. Table 4 gives the redox potential of some of these reagents.

When pyocyanin is first used to increase the rate of O_2 consumption, the addition of an appropriate concentration of KCN will lower the rate to normal, neutralizing the high potential produced by pyocyanin (Runnström 1933). Pyocyanin prevents *Echinarchnis parma* eggs from dying at the 2-cell stage when placed in sea water containing LiCl.

When unfertilized eggs placed in solutions containing HCN, which normally has no effect on the rate of respiration, are subjected to a high concentration of pyocyanin, there is an increase in the rate of respiration.

Methylene blue and certain redox indicators have an equivalent effect to that of pyocyanin, as shown by Barron (1929) and Barron and Hoffmann (1930) in experiments on *Arbacia* and *Asterias* eggs. Unfertilized eggs were not affected by HCN, but the rate of respiration was raised by methylene blue and certain redox dyes. The E_0 of methylene blue is in the same region of the redox scale as that of pyocyanin and should give similar results. When Lithium plus CO are used, vegetalization results (Runnström 1933) because both inhibit certain enzyme systems at different regions of the redox scale. This is discussed in the section on CO and HCN.

Cysteine at .04 M produces many exogastrula (Lindahl 1940). The cysteine-cystine system has a low redox potential (see Table 4). When it is added at this concentration to larva, vegetalization is not increased by lithium chloride. The same result occurs when partial anaerobiosis and lithium are used together. Since both reagents react by producing a negative potential, the result is vegetalization.

Lindahl (1933) found that the effects of adding NaSCN to larvae, thereby produced animalization, but that this could be prevented by the addition of KCN. Here again is the counter effect of a negative potential against a positive one.

Ca-free sea water produces vegetalization, but the addition of NaSCN which produces a positive potential, completely animalizes the larva as found by Lindahl (1933). This is also the case with heavy metals which activate the apical end to such an extent that in some cases the

endoderm is completely inhibited and endoderm-free larvae are produced (Waterman 1937).

Lindahl (1936) states that solutions containing NaI and Ca-free sea water produce animalization. The addition of lithium to this solution produces a decrease in the rate of O_2 consumption, the decrease becoming greater as the concentration of lithium was increased. This is another case where the first two reagents produced a more positive potential which was lowered by the addition of lithium producing a negative potential and bringing the summation of the separate potentials to the normal value.

These are but a few of the many examples obtained by many investigators. They can be explained by the factor of change in redox potential which governs the activity of the various enzyme systems. The results depend upon concentration of reagents used in the experimental solutions with respect to each solution. Their action can be explained by noting which link in the respiratory chain is inhibited.

One can conclude that the difference between ectoderm and endoderm is one of the relative redox potential with respect to the enzymes at each end of the larva, and that ectoderm and endoderm can be interchanged by lowering or raising the redox potential.

Mitochondria and Pyridine nucleotides

In the process of evolution, differentiation occurs at a higher energy level which requires a more positive redox potential. The more complex a living structure becomes, the higher is its development in the evolutionary scale. When lower energy levels are produced, the cell loses its ability to produce forms characteristic of its specialization.

The position of the nucleus in the echinoid egg is of importance in explaining the effects of reagents on growth. Child (1953) found that the region around the nucleus has the highest oxidation rate, and therefore a more positive potential than the other regions. The mitochondria are found to have a positive potential as shown by staining experiments with redox indicators. The mitochondria and granules of the nucleus stain blue with methylene blue and other positive redox dyes, and do not reduce them, thus showing that the potential is in the positive region of the scale. Child found that janus green, an indicator with an E_0 in the negative region of the scale, produces vegetalization. Leuthart and Muller (1948) have shown that janus green interferes with the activity of mitochondria in rat liver. See also Lindahl (1942). If therefore the granules of the cytoplasm which contain mitochondria are instrumental in the results of growth differentiation, then a change in the redox potential by these agents would be very important.

It has been suggested that mitochondria are responsible for the changes produced by the rise in activity of the enzymes at certain stages of development. Any reagent which lowers the redox potential would produce profound changes in the subsequent development of the larva.

The mitochondria are generally considered to catalyze the oxidation of intermediate enzyme systems of the Krebs cycle such as succinate. They oxidize the pyridine nucleotides which are a link in the chain to the flavo-protein-cytochrome systems.

It has been shown by Conn (1957) that mitochondria isolated from lupine seedlings catalyzed the oxidation of intermediate enzyme systems of the respiratory series, and that there are similarities between the reactions of plant and animal mitochondria. It is known that the activated hydrogen of the substrate in the respiratory enzymes does not act directly with the cytochrome systems but through intermediate systems of at least two reversible reduction systems.

One of these, a coenzyme, is one of the pyridine nucleotides, which is generally considered to be a highly specific electron acceptor. The result of this reaction is a reduction of the pyridine nucleotides and subsequent oxidation of the substrate, which in living cells are the flavoproteins, transferring two electrons and one hydrogen. Changes in the rate of oxidation or reduction therefore, of this important link will result in profound changes in the growth of the cell.

Gustafson and Hasselberg (1951) state that lithium treatment during cleavage stages inhibits the rise in activity of certain enzymes including apyrase, cathepsin II, glutaminase and succinic dehydrogenase. They postulate that the ectodermal development is characterized by a more important mitochondrial activity than the mesodermal or endodermal. Lithium interferes with the development of the mitochondria decreasing its activity.

It can be concluded that the more negative redox potential produced by lithium changes the ratio of oxidants to reductants to a lower energy level so that normal growth is not attained.

Succinic dehydrogenase

This enzyme system is one of the main links between the cytochrome c-oxidase system and the flavoproteins in the respiratory chain. Any reagent which inhibits the activity of this enzyme, will inhibit the rate of respiration and raise the ratio of reductants over oxidants. Both cyanide and lithium chloride inactivate this enzyme because they lower the redox potential to a negative value.

Gustafson and Hasselberg (1951) found changes in activity of various enzymes during normal growth and when the larvae were lithium-treated. They found that lithium inhibits the activity of succinic dehydrogenase; that there is a strong rise in activity of this enzyme at the blastula stage when the endodermal plate is formed. This also agrees with Child's observation that at this stage the secondary mesenchyme cells are more positive in potential, as discussed elsewhere. The negative potential produced by lithium would account for the production of exogastrula as a factor in the inhibition of the activity of this enzyme.

Calcium activates this enzyme system. Larva cultured in a solution

of lithium chloride, recover towards normality when replaced in solutions containing CaCl_2 .

Discussion

An analysis of the causes of vegetalization and exogastrulation in echinoid eggs and larvae, produced by various reagents not chemically related but producing the same result, has been shown to be caused by the deviation from normal of the oxidation-reduction potential.

The redox potential is a designation of the energy level necessary to activate specific enzyme systems. When therefore, the potential is changed to an oxidation state more negative than normal, the respiratory enzymes systems are unable to function at their normal capacity. The inhibition may be partial or complete at any region of the redox scale, depending upon the reagent used, as shown in the previous pages. Any abnormal change is reflected along the entire respiratory chain so that only those growth patterns can be produced which can be formed at lowered energy levels. The highest energy level occurs when the redox potential is most positive, that is, when the cytochrome-oxidase system is most active in order to activate molecular oxygen.

In the sea urchin and certain echinoids, the apical end of the larva has a more positive redox potential than the basal end, and produces certain organs which do not form at a lowered potential. When lithium ion is used in sea water, there is an ion exchange between lithium and the other alkaline metal ions normally present. Lithium ion has the lowest energy level of these ions, inhibiting those organs produced normally. In extreme cases of lithium inhibition in early stages, the ectoderm may be entirely reduced to endoderm, giving off cells into the blastocoel so that the whole endoderm becomes an irregular solid mass of undifferentiated cells. This bears a resemblance to the condition found in the higher animals in cancer studies.

The secondary mesenchyme cells of the blastocoel have a definite function in forming the endodermal plate which has been shown to have a more positive redox potential than the surrounding endoderm. Under conditions of lowered potential, the endodermal plate does not form certain differentiated organs, but merely produces cells which extend outwards into the sea water forming the exogastrula.

The whole problem of normal development rests upon the fundamental concept that the normal cell is subject to a definite energy level for growth. The metabolism of the cell depends upon a delicate balance of the various biochemical reactions of the activity of the respiratory enzyme systems controlled by the oxidation reduction potential. In short, there must be a definite rate of electron exchange and hydrogen transport by the enzyme systems for sufficient energy for the life processes. The oxidation-reduction potential is the master determinant.

Most of our knowledge as distinguished from hypothesis concerning enzymes has been obtained by the destruction of living protoplasm. We know little concerning the internal relations of enzyme systems in living

and apparently uninjured organisms. In living cells are factors which cannot be found in isolated biochemical experiments and interpretations must be made to show the relations of the enzymes present in their balanced connections with each other. It still remains to be found how the correlation between intact enzymes in the living cell react under different conditions. Biochemical isolation of enzymes is of course the beginning and extremely important, but in the final analysis, the relation between enzymes in their growth changes, and the balance with respect to each other in living cells, are fundamental.

A perfect example of the exact state of oxidation is the activation of the chloroplasts in the photosynthesis of green plants by the exact wave length of solar energy which changes CO_2 and water to starches and sugar.

These experiments described here and this conclusion plainly demonstrates that the limiting factor common to all these results is due to the change in potential to a more negative value produced by the inhibition of various enzyme systems at different levels in the redox scale, but all resulting in a lowered energy level.

Summary

The underlying factor in all these experiments is the matter of energy levels as indicated by oxidation-reduction potentials, and the importance of a correct potential in controlling the activation of the enzyme systems upon which growth and development of living cells depends.

In order to produce a definite structure in an organism, work is required. This is designated as energy produced by certain chemical reactions catalyzed by definite enzymes in a chain of enzyme reactions.

The E. M. F. as a measure of work of the reaction and translated into volts is indicated by the oxidation-reduction potential produced. There is a direct ratio between high redox potential and the production of energy which results in the growth of those parts of the organism requiring these factors. At a more negative potential these cells cannot function and merely produce results consistent with the reduced energy available.

In explaining variations in shape and form by different redox potentials, it is interesting to refer to Daniels, Matthews, and Williams (1929) who state that "the more positive the value of the redox potential, the more effective is the ion in the higher state of oxidation as an oxidizing agent; and conversely, the more negative the oxidation potential, the more powerful is the ion in the lower state of oxidation as a reducing agent." This explanation holds for the production of exogastrula in sea urchin and other echinoid eggs, subjected to the reagents described in these pages.

It has been shown that the production of a negative redox potential in various ways as affecting the different enzyme systems is the limiting factor in the formation of exogastrula.

The special case of lithium chloride upon which most of these experiments herein described is predicated, shows definitely how much greater the negative redox potential becomes when lithium is added to sea water.

References

- Axelrod, A. E., V. R. Potter, and C. A. Elvehjem, 1942: The succinoxidase system in riboflavin deficient rats. *J. Biol. Chem. (Am.)* **142**, 85—87.
- Ahlgren, G., 1925: *Acta Med. Skand.* **57**, 508.
- Barnard, R. D., 1955: The effect of cyanide and of variation in alkalinity on the oxidation reduction potential of the Hb-methemoglobin system. *J. Gen. Physiol.* **16**, 657—675.
- Barron, E. S. G., 1929: The effect of methylene blue on the oxygen consumption of sea urchin eggs. *J. Biol. Chem. (Am.)* **81**, 445—448.
- and L. A. Hoffman, 1930: The catalytic effect of dyes on the oxygen consumption of living cells. *J. Gen. Physiol.* **13**, 485—494.
- Bergman, M., 1942: A classification of proteolytic enzymes. *Adv. Enzymol.* **2**, 49—68.
- Beutner, R., 1957: Pacemaker activity through Osterhout's *Nitella* experiments. *J. Comp. Cell Physiol.* **50**, 349.
- Brooks, M. M., 1932: Methylene blue as an antidote to cyanide poisoning. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **29**, 1228—1230.
- 1935: Methylene blue as an antidote to CO poisoning. *Amer. J. Physiol.* **104**, 139—141.
- 1941: Further interpretations of the effects of CO and CN on oxidations in living cells. *Biol. Bull.* **81**, 284.
- 1946: The mechanism of fertilization of eggs. *Growth* **10**, 591—410.
- 1956: Changes in the growth of marine eggs as affected by changes in the redox potential. *Protoplasma* **46**, 104—107.
- Brooks, S. C., and M. M. Brooks, 1941: The Permeability of living cells. *Protoplasma-Monographie*, vol. 19. Berlin-Zehlendorf: Gebrüder Borntraeger.
- Chance, R., and G. R. Williams, 1956: The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.* **17**, 65—134.
- Clark, W. M., 1928: Studies on oxidation reduction. U. S. Public Health Service, Hygienic Laboratory, Bull. No. 151, Washington, D. C.
- Child, C. M., 1935: Differential reduction of vital dyes in the early development of echinoderms. *Arch. Entw.mechan.* **135**, 426—456.
- 1936: A contribution to the physiology of exogastrulation in Echinoderms. *Arch. Entw.mechan.* **135**, 457—493.
- 1953: Indicator patterns in relation to echinoderm exogastrulation. *Biol. Bull.* **105**, 62—79; *Physiol. Zool.* **26**, 28—58; *Biol. Bull.* **104**, 12—27.
- Dan, K., and K. Okazaki, 1956: Role of the secondary mesenchym cells in the formation of the primitive gut in sea urchin eggs. *Biol. Bull.* **110**, 29—42.
- Daniels, Mathews, and Williams, 1929: *Experimental Physical Chemistry*. McGraw-Hill, Book Co., New York.
- Eucken, A. E., E. R. Jette, and V. K. LaMer, 1925: *Fundamentals of Physical Chemistry*, McGraw-Hill, Book Co., New York.
- Fromageot, C., 1947: Oxidation of organic sulfur in animals. *Adv. Enzymol.* **7**, 369—407.
- Gustafson, T., and I. Hasselberg, 1951: Enzymes in the development of sea urchin eggs. *Exper. Cell Res.* **2**, 642—672.
- Hamburger, V., 1957: The life history of a nerve cell. *Amer. Scientist* **45**, 263—277.
- Harvey, W. R., and C. M. Williams, 1958: Cyanide-sensitivity of the heart beat of the *Cecropia* silkworm. *Biol. Bull.* **114**, 36—53.

- Herbst, C., 1892: Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss der veränder-
ten chemischen Zusammensetzung des umgebenden Mediums auf die Entwicklung
der Tiere. I. Versuche an Seeigeleiern. Z. wiss. Zool. 55, 446—518.
- 1893: Weiteres über die morphologische Wirkung der Lithiumsalze und ihre
theoretische Bedeutung. Mitt. Zool. Stat. Neapel II, 136—220.
- 1896: Die formative Wirkung des Lithiums auf befruchtete Eier von *Asterias
glacialis*. Arch. Entw.mechan. 2, 455—516.
- 1897: Über die zur Entwicklung der Seeigellarven notwendigen anorganischen
Stoffe, ihre Rolle und ihre Vertretbarkeit. I. Die zur Entwicklung notwendigen
anorganischen Stoffe. Arch. Entw.mechan. 5, 649—793.
- 1904: Die Rolle der notwendigen anorganischen Stoffe. Arch. Ent.mechan.
17, 506, 520.
- Hildebrand, J., and R. E. Powell, 1937: Principles of Chemistry. MacMillan
Co., New York.
- Horstadius, S., 1935: Die Determination bei Seeigeln. Publ. Staz. Zool. Neapel,
14, 251—429.
- Johnson, Frank H., 1947: Bacterial luminescence. Adv. Enzymol. 7, 205—264.
- Leuthart, F., and A. F. Muller, 1948: Janus green in rat livers. Experientia
4, 478—480.
- Lindahl, P. E., 1935: Über animalisierte und vegetativisierte Seeigelkeime. Arch.
Entw.mechan. 128, 300—338.
- 1936: Zur Kenntnis der physiologischen Grundlagen der Determination im See-
igelkeim. Acta Zool. 17, 179—365.
- 1939: Zur Kenntnis der Entwicklungsphysiologie des Seeigels. Z. vergl. Physiol.
27, 235—250.
- 1940: Neue Beiträge zur physiologischen Grundlage der Vegetativisierung des
Seeigelkeimes durch Lithiumionen. Arch. Entw.mechan. 140, 168—194.
- 1942: Eine Bemerkung zu der Arbeit „Lithium und Echinoderm exogastrula“.
Protoplasma 36, 558—570.
- 1951: On the accumulation of inorganic pyrophosphate in the cleaving sea
urchin egg caused by lithium ion. Ark. Kemi 3, 97.
- and H. Holter, 1940: Die Atmung animaler und vegetativer Keimhälfen von
Paracentrotus lividus. C. r. trav. lab. Carlsberg, Ser. Chim. 23, 257—287.
- and L. O. Ohman, 1938: Weitere Studien über Stoffwechsel und Determination
im Seeigelkeim. Biochem. Zbl. 58, 179—218.
- and A. Stordal, 1937: Zur Kenntnis des vegetativen Stoffwechsels im Seeigel-
keim. Arch. Entw.mechan. 136, 44—65.
- B. Swedmark, and J. Lundin, 1951: Some new observations on animaliza-
tion of sea urchin eggs. Exper. Cell Res. 2, 39—46.
- Mahler, H. R., 1956: The nature and function of metalloflavoproteins. Adv. En-
zymol. 17, 235—291.
- Moore, A. R., 1941: On the mechanism of gastrulation in *Dendroaster excentricus*.
J. Exper. Zool. 87, 101—111.
- McCutcheon, M., and B. Lucke, 1928: The effect of certain electrolytes and
non electrolytes on the permeability of living cells to water. J. Gen. Physiol. 12,
129—158.
- Neurath, H., and G. H. Dixon, 1957: Symposium on the structure and function
of proteins. Federation Proc. 16, 791—801.
- Norris, W. E., Jr., and H. Rosene, 1955: Simultaneous measurements of redox
potential and of the velocity of reduction of redox indicators in the onion root.
Biodynamica 7, 257—272.

- Pease, D. C., 1942: Echinoderm bilateral determination in chemical concentration gradients. II. *J. Exp. Zool.* 89, 329—345.
- Ranzi, S., und M. Falkenheim, 1937: Recerchi sulle basi fisiologiche della determinazione nell'embrione degli Echinodermi. *Pubbl. Staz. Napoli* 16.
- Runnström, J., 1928: Zur Experimental-Analyse der Wirkung des Lithiums auf den Seeigelkeim. *Acta Zool. Stockh.* 9, 365—424.
- 1929: Über die Veränderung der Plasma-Kolloide bei der Entwicklungserregung des Seeigels. *Protoplasma* 5, 201—310.
- 1935: Kurze Mitteilungen zur Physiologie der Determination des Seeigelkeimes. *Arch. Entw.mechan.* 129, 442—444.
- 1935: An analysis of the action of lithium on sea urchin development. *Biol. Bull.* 68, 378—384.
- 1935: On the influence of pyocyanine on the respiration of sea urchin eggs. *Biol. Bull.* 68, 327—354.
- Schou, M., 1937: Biology and pharmacology of the lithium ion. *Pharm. Reviews* 9, 17—58.
- Stotz, E., and A. N. Hastings, 1937: The components of the succinate-fumarate enzyme system. *J. Biol. Chem.* 118, 479—498.
- Sumner, J. B., and G. F. Somers, 1943: Chemistry and methods of enzymes. Academic Press, Third Edition, New York.
- Tauber, H., 1949: Chemistry and technology of enzymes. Wiley & Sons, New York.
- Von Ubsch, L., 1925: Entwicklungsphysiologische Studien am Seeigelkeim. *Z. Wiss. Zool.* 124, 469—486.
- 1929: Über die Determination der Larval-Organen und der Imaginalanlage bei Seeigeln. *Arch. Entw.mechan.* 117, 80—122.
- Waterman, A. J., 1937: The effects of isotonic salt solutions upon the development of the blastula of the sea urchin. *Biol. Bull.* 75, 401—420.

Robert Chambers—Pioneer in Micromanipulation

By

B. W. Zweifach and M. J. Kopac

New York University, New York

(Received February 23, 1959)

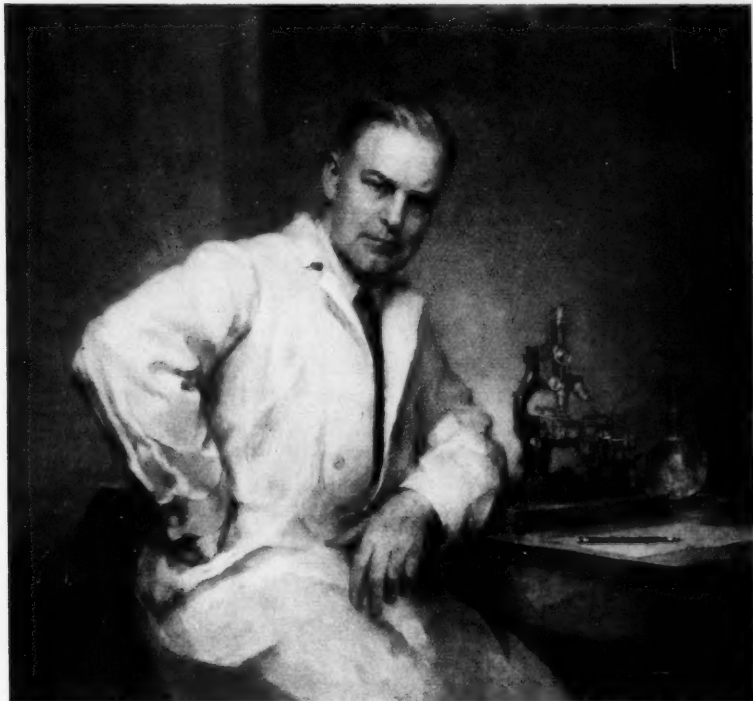
With the death of Robert Chambers at the age of seventy-five on July 22, 1957, biology lost one of the most illustrious members of its old guard—marking, as it were, the passing of an era in which use of the microscope had been developed into a fine art for the study of cellular behavior and protoplasmic structure.

Chambers was born (October 23, 1881) and raised in Turkey, where his parents resided as missionaries. The rough, harsh life during his formative years left an indelible imprint on his makeup and was to a considerable extent responsible for his great compassion for the underdog and his willingness to champion humanitarian causes. It was at Roberts College in Istanbul that his boyhood interest in nature was crystallized and his future course set. Later, under the aegis of R. Hertwig and Goldschmidt in Munich, where he received his Ph.D. in 1908, Chambers was indoctrinated into the field of histophysiology and developed a keen interest in basic embryology. His doctoral thesis under R. Hertwig dealt with "Der Einfluß der Eigröße und der Temperatur auf das Wachstum und die Größe des Frosches und dessen Zellen." In the summer of 1911, Chambers was a graduate investigator and in 1912 became a member of the teaching staff in Zoology and Embryology at the Woods Hole Marine Biological Laboratory—a course in these days associated with such names as Calkins, Lillie, Conklin, Morgan and Wilson. By 1914 it became apparent that Chambers' interests were not along the lines of conventional zoology and he was therefore listed as an investigator in Physiology—an indication that the science of cellular physiology had come of age.

He returned to Canada, the early home of the Chambers family, and eventually joined Cornell Medical College in 1915, where he remained until 1928. These were his most fruitful years—his outstanding contributions in large part derived from his ingenious researches at Woods Hole. His laboratory was a beehive of activity where Chambers' dynamic personality infused all who worked with him. Few could keep pace with

his amazing physical stamina and drive. At an early age Robert Chambers became virtually a legendary figure, not only because of his scientific stature but because of the anecdotes which grew up around his prodigious unconcern for practical matters.

In 1928 he transferred from the Anatomy Department at Cornell to the Department of Biology at New York University, where he maintained until



retirement in 1949 as Professor Emeritus a research center which attracted from every country of Europe, from Asia, and from South America, men who today are outstanding figures in scientific research.

The magnitude of Robert Chambers' contribution becomes all the more impressive when it is considered that he published over 230 scientific articles, bearing in mind the fact that writing was extremely burdensome for Chambers. A great deal of what he did, he left for others to put into words. He unflaggingly, to the point of self-denial, gave his time and counsel to a never-ending stream of students, associates, cronies, and visitors. Time was a meaningless entity to him.

In 1912, at a seminar session of the Woods Hole Marine Biological Laboratory, Chambers was greatly stimulated by a lecture in which

George L. Kite showed that it was possible to interfere with the development of marine ova with glass microtools. In retrospect, we can see that this event proved to be the turning point in his scientific career. The potentialities of this approach appealed so much to Chambers that he developed and applied the microsurgical technique extensively, his name becoming synonymous with the micromanipulative method. Not only did Chambers become a past master in the art and science of micrurgy, he also was instrumental in developing an excellent micromanipulator and a simple, highly effective method for microinjection. The many other methods he devised for handling living cells, fabricating microneedles and micropipettes, are still being used today. His enthusiasm was such that every aspect of cellular behavior to which micrurgy could be applied intrigued him—the cohesion of blastomeres in developing embryos, the action of salts on protoplasm, the nature of vital staining, the interfacial tension of protoplasmic surfaces, the properties of extraneous coats, the pH of cytoplasm, the acid of injury, the structures and mechanisms involved in cell division, etc. In collaboration with his life-time associate, C. G. Grand, he prepared an impressive series of beautiful motion picture demonstrations of the capacity of the protoplasm and cell surface to recover from various forms of microinjury.

Later, Chambers combined tissue culture with microtechniques. Especially noteworthy were his studies on malignant cells, the secretory activity of kidney tubules and chemotactic phenomena. During World War II, he devoted a goodly part of his energies to studies on capillary permeability and to the vascular sequelae of experimental shock. New and important concepts of circulatory homeostasis were originated in his laboratory.

Chambers' writings are pregnant with isolated bits of information, any one of which represents a major contribution. For example, his demonstration of a plasma membrane by showing that dyes injected into cells do not pass out into the surrounding medium; that fragments of the denuded plasma membrane behave like oil drops; the nature of the cilia in epithelial cells; the disappearance and apparent regeneration of the brush border in kidney tubular cells in tissue culture; the irrevocable, toxic effect of injury to the nucleolus and nucleus; the repair of torn surfaces in the presence of electrolytes; the gelated state of the aster and spindle and their changes during mitosis, etc.

A mere listing of his observations could not by itself begin to indicate his impact on the scientific history of his time. Although experimental morphology had begun to develop as a primary area of investigation, the highly imaginative and intuitive approach of Chambers represented the very essence of this movement. As one of his contemporaries so aptly stated: "Micromanipulation offers an opportunity to develop such a concept of the dynamic of the living cells as has not heretofore been possible."

His earliest scientific investigations were concerned with the nature of cell injury [1]. Death of the cell was found to be associated with the destruction of the plasma membrane. The cytoplasm showed a remarkable

ability to form a protective gel film on injury, whereas injury to the nucleus by micropuncture invariably led to cytolysis and destruction of the cell, especially in starfish oocytes and chick fibroblasts. He made the interesting observation that puncture of one nucleus in a binucleate fibroblast did not lead to destruction of the cell. The importance of the nucleolus was recognized in studies with Fe 11 [2] where it was found that the nucleolus could not be damaged without a lethal effect on the cell.

Chambers was able to demonstrate an acid of injury in amoebae where it was found with indicator dyes that a loss of acid from the cells into the medium proper preceded cytolysis [3]. The cytoplasm shifted toward the acid pH, approximately in the region of 5.4, while the cytoplasmic granules showed little or no change in pH during injury response.

In coming to grips with the problem of the nature of the cell surface, Chambers called attention to the fact that many investigators were mistakenly attributing to the cell surface properties actually due to coats of varying consistency and thickness [4]. In line with the work of Curt Herbst, he showed that all protoplasmic bodies (cells) were covered with an extraneous coat. In plants, this component is represented by lamellae. In animal cells, the extraneous coat, which arises as an interaction between an exudate of the cell protoplasm and cations in the surrounding medium, was continuously being sloughed off. The extraneous material is both pH and calcium dependent and served not only as a cohesive element binding adjacent cells together but had a stabilizing function on the underlying protoplasmic surface film. Later, he concluded on the basis of tissue culture studies of kidney tubules and microscopic examination of living blood capillaries, that the physical and chemical state of the cement was an important factor in maintaining the permeability of barriers composed of sheets of cells [5].

Chambers compiled information concerning the Protoplasmic Surface Film (PSF) which would have been unobtainable by any method other than micromanipulation [6]. He states that the true surface is in the form of a film, completely separate from any extraneous coating which the cell may have. He believed that this film was being continuously formed and renewed, since slight tear in the surface with a microneedle was quickly walled over.

In studies with Reznikoff [7], Chambers showed that monovalent ions (sodium) weaken the PSF, whereas bivalent ions (magnesium and calcium) had a stabilizing effect. The PSF could be repaired in the complete absence of electrolytes, as in the case of *Amoeba dubia* in distilled water.

Chambers provided evidence that the PSF was not analogous to an interfacial film [3]. He states: "The fact that a time factor is involved in its production, that it protects underlying cytoplasm from disintegration, that its durability depends not only upon its enviroing medium but also upon the specific constitution of the protoplasm from which it forms and finally its semi-permeable properties point to a definite organized structure."

Chambers was concerned about the emphasis being placed on the biochemical properties of isolated, subcellular structures obtained as products of homogenates. He frequently pointed out that the isolation of subcellular particles involves destruction of the cell—which not only leads to visible morphologic changes but even the more subtle chemical and physical changes as well.

To this end, one of Chambers' favorite projects was focused on the development of a cytoplasmic "Ringers" solution. Based on his earlier studies on the effects of monovalent and divalent inorganic cations on amoeba cytoplasm [7], much work was done by him to determine the effects of mixtures of salts. The plasmodium of the slime mold, *Physarum*, served as a test organism. Although a fully innocuous cytoplasmic medium was never achieved, Chambers' work clearly showed that the most indifferent fluids must contain a higher proportional amount of potassium and calcium over the usual amounts found in extracellular physiologic salt solutions. Regretfully, he was fully aware of the possibility that different types of cells would require different salt mixtures.

In a series of studies with Kopac [8, 9], Chambers investigated the physical and chemical properties of the PSF. The fact that spontaneous coalescence between a cell and an oil drop occurs, indicated to them that the physical state of the cell surface was essentially that of a liquid. By using the phenomenon of oil capping, they were able to determine whether the surface of a particular cell was a solid (where capping occurs). If neither occurred, the oil drop probably failed to establish contact with the surface of the cell.

Many workers felt that the selective permeability of the cell was exclusively a function of the PSF. Chambers, by microinjection studies with dyes, was able to show that the permeability of the cells to dye stuffs was affected by different factors. Included among these were the selective properties of the PSF, conditions such as local acidity within the internal protoplasm (local acidity), and the metabolic activity of the cell (uptake of phenol red by kidney tubular cell) [10].

On the basis of permeability to dyes and to different electrolytes, Chambers concluded that the PSF was lipoprotein in nature, a concept supported by most workers in this field today.

The relative impermeability of the cell could also be shown to be in part a function of the PSF. Thus substances which normally did not enter the cell, could be introduced by microinjection without necessarily a toxic effect. These substances (e.g., dyes) remained within the cell and did not pass into the environment. The importance of the PSF in maintaining the integrity of the cell was shown in ingenious freezing experiments where it was found that cells could be sub-cooled far below their internal freezing point so long as the PSF remained intact [11]. Death was invariably associated with a breakdown of the plasma membrane and a subsequent loss of the integrity of the protoplasm which followed the formation of ice crystals.

The micromanipulative method served as an ideal means for studying

intracellular redox potentials. In collaboration with Cohen and Pollack [12, 13], Chambers published an important series of papers in which the rH was measured in a variety of cells under different conditions. The rH apparently shifted in the presence and absence of oxygen in the environment, a finding in which Chambers disputed the previously accepted assumption by the Needhams that the oxidation-reduction factor remained relatively constant but differed in particular living cells.

By means of the micromanipulative technique, Chambers was able to point out the inadequacy of older procedures for studying the pH of protoplasmic structures. He concluded that a single pH value for the cytoplasm as a whole was erroneous, since different parts of the cells interior exhibited different pH values [14]. Many dyes penetrated poorly, others tended to accumulate in droplets, fat granules, etc.

Inasmuch as the penetrability of different indicators varied considerably, it was preferable to inject dyes directly into the cell. He states "the pH value refers to the aqueous phase of three different regions—(a) hyaline aqueous matrix of the cytoplasm (buffered); (b) acid or basic vacuoles whose pH varies with the environment; (c) the nucleoplasm, whose matrix was basic, showing a pH of 7.6 to 7.8." Chambers preferred to apply the term "cellular pH" to the aqueous phase of the protoplasm.

In an important series of studies with Reznikoff, Pollack and Cohen [15, 16], he demonstrated that all dyes gave a consistent indication of protoplasmic pH at 6.7 ± 0.1 . Following injury, the pH of the cytoplasm dropped to levels as low as 5.5, whereas the nucleus showed no comparable shift in pH. The so-called vital stains were found to be segregated into cytoplasmic inclusions, where the resulting pH need have no reference to the pH of the cytoplasm. In one remarkable set of experiments with amoebae [17], he allowed the animals to be colored by neutral red which diffused into the cell and accumulated in the granules and then injected a diffusible, blue indicator dye. It was then possible to show that with changing conditions, the hyaline cytoplasm did not change in pH, whereas the intracellular inclusions did. The evidence clearly indicated that the cytoplasm was strongly buffered whereas the pH of the granular inclusions varied considerably.

One of Chambers' primary interests was the factors affecting cell division and development. The nucleus was shown to be a highly porous structure, with no evidence of chromosomal material under ordinary circumstances. He studied the nature of the chromosomal strands in the grasshopper and in *Tradescantia* [18]. The chromosomes were found to be gelled structures which could be stretched enormously without destroying their physical characteristics. The micromanipulative studies led to an awareness of the fact that physiological salt solutions were injurious to nuclear structures.

Components of the aster during cell division were examined with delicate microneedles [19]. During cell division, the spindle could be isolated intact, although it disintegrated rapidly. The structures consisted of a central liquid sphere from which emanated the characteristic rays—

actually channels in which centripetal flow occurs. The cytoplasm between the rays was shown to be in a gel state, giving the rigidity to the aster configuration. The actual division of the egg into two blastomeres was essentially due to the growth of two semisolid masses, the amphiaster. The aster could be deformed with microneedles and moved about in the interior of the cell without damage. Following cleavage, the interior then reverted to a more fluid state.

Very early in his work, Chambers became interested in the fertilizability of different parts of the egg [20]. The micromanipulator provided an ideal tool for such surgery. Chambers found that the part of the starfish egg chiefly concerned in development lay in its periphery. The interior of the egg was incapable of developing when separated from the cortex. Both nucleated and non-nucleated fragments could be fertilized, although the embryos from the latter were smaller than normal.

Chambers' work on tissue culture with Gladys Cameron deserves special mention [21]. In studies on the behavior of kidney tubular cells he was able to show that the cells in the proximal tubules of the chick mesonephros had a gradient of permeability to dyes dependent upon metabolic mechanisms, which enabled them to secrete substances such as phenol red into the lumen against a concentration gradient, while other substances, such as trypan blue, were transferred only in a retrograde direction from the lumen to the outside of the tubules. The semi-permeable properties of the tubular membrane in tissue cultures were found to depend upon the presence of calcium in the medium, presumably through an effect of the intracellular cement [22]. In the absence of calcium, the cement disintegrated, the tubules lost their permeability gradient, and the cells tended to round up in random fashion. With the restoration of calcium, the tubules re-oriented themselves and again began to demonstrate a gradient of permeability in both directions.

The studies with calcium and intercellular cement were carried over into the permeability of the blood capillary barrier where it was shown that calcium deficient states led to a free passage of proteins and blood cells into the intravascular spaces [23]. Chambers and Zweifach [24] postulated that the permeability of the blood capillary wall depended more upon the forces holding the endothelial cells together than the behavior of the cells themselves.

In his later years, Chambers devoted himself to tissue culture studies of tumor cells. He found that there were no obvious differences in the physical makeup or organization of neoplastic cells in comparison to normal cells under *in vitro* conditions [25, 26].

Chambers was a part of the transitional era when scientists were turning from subjective descriptions and inquiry towards an examination of the physical and biochemical attributes of protoplasmic constituents. In the light of today's more sophisticated methods of investigation, some of his observations, approaches and even interpretations may appear crude. Following his retirement, many advances have been made in micurgical instrumentation and the application of electronics to facilitate the accumu-

lation and classification of the experimental data that he so laboriously was striving to obtain.

Despite the lack of more highly refined approaches to the study of living cells, Chambers had the courage to come to grips with an area of dynamic cytology which still remains largely unexplored and only poorly understood. We owe a great debt to Robert Chambers for his leadership, his infectious exuberance, his tremendous stimulation to both students and colleagues. It is now up to the successors of the Chambers' heritage to extend his pioneering studies.

Above all, his humane qualities transcended even his outstanding scientific achievements. We are certain that the imprint of Robert Chambers indomitable spirit will live on in those of us who were fortunate enough to know him, to work with him, and to contribute some small part to the fruits of his exciting labors.

Selected References

- [1] Microdissection studies. I. The visible structure of cell protoplasm and death changes. *Amer. J. Physiol.* **43**, 1—12, 1917.
- [2] (With H. B. Fell) Micro-operations on cells in tissue cultures. *Proc. Royal Soc. B*, **109**, 380—403, 1931.
- [3] The nature of the living cell as revealed by microdissection. *Harvey Lectures*, ser. 22, pp. 41—58, 1926—1927.
- [4] The physical structure of protoplasm as determined by microdissection and injection. *Cowdry's Cytology*, chapter V, 1924.
- [5] The relation of extraneous coats to the organization and permeability of cellular membranes. *Cold Spring Harbor Symposium, Quant. Biol.* **8**, 144—153, 1940.
- [6] Micrurgical studies of the kinetic aspects of cell division. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 1311—1325, 1951.
- [7] (With Paul Reznikoff) Micrurgical studies in cell physiology. I. The action of the chlorides of Na, K, Ca, and Mg on the protoplasm of *Amoeba proteus*. *J. Gen. Physiol.* **8**, 369—401, 1926.
- [8] (With M. J. Kopac) The coalescence of sea urchin eggs with oil drops. *Carnegie Inst., Washington, Yearbook*, 1936—1937, p. 80—89.
- [9] (With M. J. Kopac) The coalescence of living cells with oil drops. I. *Arbacia* eggs immersed in sea water. *J. Cellul. & Comp. Physiol.* **9**, 331—343, 1937.
- [10] Vital coloration of protoplasm. *Collecting Net*, **7**, 193, 1932.
- [11] (With H. P. Hale) The formation of ice in protoplasm. *Proc. Roy. Soc. B*, **110**, 356—352, 1932.
- [12] (With B. Cohen and H. Pollack) Intracellular oxidation-reduction studies. IV. Reduction-potentials of European marine ova and *Amoeba proteus* as shown by indicators. *Protoplasma* **17**, 376—387, 1932.
- [13] An analysis of oxidation and reduction of indicators in the living cell. *Cold Spring Harbor Symposia in Quantitative Biology*, **1**, 205—213, 1933.
- [14] Micrurgical studies on protoplasm. *Biol. Rev.* **24**, 246—263, 1949.
- [15] (With Herbert Pollack) Micrurgical studies in cell physiology. IV. Colorimetric determination of the nuclear and cytoplasmic pH in the starfish egg. *J. Gen. Physiol.* **10**, 739—753, 1927.

- [16] (With B. Cohen and P. Reznikoff) Intracellular oxidation-reduction studies. I. Reduction potentials of *Amoeba dubia* by microinjection of indicators. *J. Gen. Physiol.* 11, 585—612, 1928.
- [17] Intracellular hydron concentration studies. I. The relation of the environment to the pH of protoplasm and of its inclusion bodies. *Biol. Bull.* 55, 569—576, 1928.
- [18] (With H. C. Sands) A dissection of the chromosomes in the pollen mother cells of *Tradescantia virginica*. *J. Gen. Physiol.* 5, 815—819, 1923.
- [19] Changes in protoplasmic consistency and their relation to cell division. *J. Gen. Physiol.* 2, 49—68, 1919.
- [20] (With Hiroshi Ohshima) Merogony experiments on sea-urchin eggs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 19, 320—321, 1922.
- [21] (With G. Cameron) Direct evidence of function in kidney of an early human fetus. *Amer. J. Physiol.* 125, 482—485, 1928.
- [22] Calcium and intercellular cement of normal and cancerous epithelium in tissue culture. *Acta Univ. Intern. Contra Cancerum* 6, 696, 1949.
- [23] The cell as an integrated functional body. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 50, 817—823, 1950.
- [24] (With B. W. Zweifach) Capillary endothelial cement in relation to permeability. *J. Cellul. & Comp. Physiol.* 15, 255—272, 1940.
- [25] (With C. G. Grand and G. Cameron) Neoplasm studies I. Cells of melanoma in tissue culture. *Amer. J. Cancer* 24, 36—50, 1935.
- [26] (With G. Cameron) Neoplasm studies. III. Organization of cells of human tumors in tissue culture. *Amer. J. Cancer* 50, 115—129, 1937.

Referate

Höfler, K.: Permeabilitätsstudien an Parenchymzellen der Blattrippe von *Blechnum spicant*. Sitzber. Österr. Akad. Wiss., math.-naturwiss. Kl., Abt. I 167, 237—295 (1958).

The expression permeability designates a quality of a membrane concerned with its behavior in the presence of certain substances. However, this word is often used incorrectly and even in the sense of absorption. Thus, it is highly commendable that the author stated at the beginning exactly the limits of permeability research. He also described clearly the differences in the purpose between permeability research and the investigations concerning the absorption of nutritive material and accumulation. It is the aim of permeability research to contribute to the extension of the knowledge concerning the living protoplasm. The behavior of the cell concerning the permeation of certain compounds leads to a physico-chemical means of characterizing the protoplasm and its actual state.

The principal results of permeability research until now are designated as the lipid-sieve theory and the establishment of the specific permeability series. The plasmometric method is critically discussed in its application to permeability research. Concerning the objections of Bogen the author cites the concept of Rosenberg and Wilbrandt, that an enzymatically controlled transport of substance may be brought about by the action of differences of concentrations alone. Thus, a susceptibility of a permeation process to enzyme poisons does not necessarily lead to the conclusion that active transport is involved.

After discussing some of the possible sources of error using the plasmometric method the author presents the results of his permeability measurements obtained with cells of *Blechnum spicant*. He tested ten different compounds and utilized some former experiments. The permeability constant P (units $\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$ of $\mu \cdot \text{sec}^{-1}$) is chosen as a measure of permeability. Permeability is calculated from the change of the degree of plasmolysis in unit time (ΔG) and the correction of Ashida is applied. It is appreciated that some tables showing the measured values for individual cells also contain the measurement of the cell breadth and the conversion factor for the micrometer units. Thus, it is possible to calculate the permeability constant using other formulas. The dilation of the protoplast is found to be proportional with time at first but it becomes slower in the later course of the experiments. This can be interpreted as a change in permeability which is caused by secondary effects.

The tested cells of *Blechnum spicant* belong to the standard type of permeability series (*Chara-Majanthemum* type). The ratio of the permeability constants for urea/methylurea shows approximately the normal value found for *Chara* and *Majanthemum* and the ratio of urea/glycerine is of the same magnitude as for *Majanthemum*. The protoplasm is much less permeable for erythritol, glucose and saccharose. This behavior corresponds with the results of former experiments which dealt with other material. The permeability for formamide shows a higher value as would be expected considering its solubility in lipids. This is in agreement with results found with other plants and may be interpreted as an action of permeation through pores. It may be possible that this type of permeation is also involved in the case of ethylene glycol. The author studied, in further experiments during the winter, the relation between permeability and temperatures. He also found a uniform time-course for the recovery in low temperatures.

In the last chapter it is shown in which manner the hitherto existing results of permeability research support the lipid-sieve theory. Some of the qualities of the plasma are mentioned which are important for the explanation of the differences between certain permeability series. These differences can be explained by means of variations in the magnitude of those qualities of the protoplasm. The author emphasizes finally his concept, that the resistance of the protoplasm to penetration is not merely localized in its membranes. The whole protoplasm would be effective due to the fact that lipoids are present in the mesoplasm too.

Therefore a coherent phase of lipoids exists which reaches from the external to the internal surface of the protoplasm.

Ed. Stadelmann (Columbus, Ohio)

Url, W.: Zur Wirkung der Atmungsgifte Natriumazid und Dinitrophenol auf die Permeabilität von *Blechnum spicant*-Zellen. Sitzgsber. Österr. Akad. Wiss., math.-naturwiss. Kl., Abt. I 167, 297—319 (1958).

The effect of various external factors on cell permeability has been investigated for a long time. A new type of substance was introduced into this group when enzyme poisons and other substances with a highly specific biological action was tested. It could be expected that changes of permeability caused by these compounds would lead to information concerning the strength of the relationship between permeability and cellular metabolism.

Url describes in his article the effects of two plasmic poisons on the permeability of the parenchymatic cells of the midrip of *Blechnum spicant* to urea. He also investigated its effect on protoplasts which were plasmolized in sugar.

A significant decrease of permeability can be observed if only 10^{-4} mol DNP is added to the urea solution. However, Sodium azide produces distinct changes at concentrations as high as 0.1 mol but this could be merely the result of an unspecific salt action. It should be investigated in further experiments to determine whether these differences in activity of such substances can be correlated with the inhibition of certain individual reactions (phosphorylation in the case of DNP). Systrophe is inhibited even by low concentrations of both of these poisons. This behavior corresponds to the conception that systrophe only occurs if the cell retains its total vital activity.

Cells, plasmolized in pure sugar show a very slow recovery of the protoplast which lasts several hours and is followed by a second contraction. This behavior is modified if plasma poisons are added to the sugar solution. In this case the recovery ceases more rapidly and is followed by the contraction again. It is not yet possible to give a detailed interpretation of these results due to the fact that the plasma is damaged even in pure glucose solution by the long duration of the experiment.

This publication is a valuable contribution to the complex problem which is the quantitative investigation of the changes of permeability produced by plasmic poisons. Further work of this kind would be desirable to determine more completely the differences in the magnitude of permeability changes if a greater number of plasmic poisons and similar biologically highly active substances are applied. Thus a better insight into the physico-chemical basis of the process of permeation may be obtained and new details about the organization of the protoplasm can be expected.

Ed. Stadelmann (Columbus, Ohio)

Fortsetzung von der II. Umschlagseite

Menke, W.: Myelinfiguren im Cytoplasma meristematischer Zellen	127
Moldenhauer Brooks, Matilda: Negative Oxidation Reduction Potential as the Limiting Factor for Exogastrulation in Sea Urchins	131
Zweifach, B. W. and M. J. Kopac: Robert Chambers—Pioneer in Micromanipulation	154
Referate	163

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Wehrmeyer, W.: Entwicklungsgeschichte, Morphologie und Struktur von Tabakmosaikvirus-Einschlusskörpern unter besonderer Berücksichtigung der fibrillären Formen	4. 8. 1958
Richter, I.-E.: Bewegungsphysiologische Untersuchungen an polycystiden Gregarinen unter Anwendung des Mikrozeitrafferfilms	23. 8. 1958
Wehrmeyer, W.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung der Chloroplasten und des Cytoplasmas tabakmosaik-virusinfizierter Tabakpflanzen-Zellen	23. 9. 1958
Diannelidis, Th., und K. Mitrakos: Vergleichende Untersuchungen über das Plasmalemma von Meeresalgen	4. 9. 1958
Heber, U.: Beziehungen zwischen der Größe von Chloroplasten und ihrem Gehalt an löslichen Eiweißen und Zuckern im Zusammenhang mit dem Frostresistenzproblem	28. 9. 1958
Sterling, C.: Lipoidal Crystals in Onion	14. 10. 1958
Pfeiffer, H. H.: Protoplasmatische und biorheologische Untersuchungen an pflanzlichen Milchsäften	18. 10. 1958
Meyer, J.: Le caractère précoce idioblastique des initiales stomatiques du pétiole de <i>Populus pyramidalis</i> Rozier	25. 10. 1958
Barthelmeas, A., und I. Einlechner: Chemisch induzierte Mitosen. II.	16. 11. 1958
Kümmel, G.: Feinstruktur der Wimperflamme in den Protonephridien	1. 12. 1958
Url, W.: Vergleichende Untersuchungen über die Resistenz pflanzlicher Plasmen gegen Natriumkarbonat	1. 12. 1958
Schneider, L., und K.-E. Wohlfarth-Bottermann: Protistenstudien IX. (Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Amöben unter besonderer Berücksichtigung der Feinstruktur des Cytoplasmas)	19. 12. 1958
Krisal-Knyrim, Dietlinde: Über das osmotische Verhalten von Basidiomyceten-Hyphen im Normalzustand und nach Frosteinwirkung	26. 12. 1958
Enöckl, F.: Vitalitätsprüfung reifer und überreifer Zellen aus dem Fruchtfleisch von <i>Sorbus aria</i>	19. 1. 1959
Zöttl, P.: Vitalfärbestudien mit Methylrot	23. 1. 1959
Pfeiffer, H. H.: Über die Ermittlung der kinetischen Energie von Chromosomen in der Anaphase	30. 1. 1959
Url, W.: Phasenoptische Untersuchungen an Fruchtfleischzellen von <i>Symphoricarpos racemosus</i> Michx.	9. 2. 1959
Steinlesberger, Erna: Plasmolysestudien an Laubmoosen. (II. Osmotische Werte)	16. 2. 1959
Klima, J.: Das Bild des Endoplasmatischen Reticulum von <i>Planaria alpina</i> in Abhängigkeit vom pH-Wert des Fixierungsmittels	11. 3. 1958
Lindner, Hildegard: Die lichtabhängige Vakuolisierung der Chloroplasten in Nikotinlösungen (II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen)	28. 3. 1959

SPRINGER-VERLAG IN WIEN

Protoplasmatologia

Handbuch der Protoplasmaforschung

Unter Mitwirkung hervorragender international bekannter Fachleute

herausgegeben von

Prof. **L. V. Heilbrunn** und Prof. **Dr. Friedl Weber**
Philadelphia Graz

Im Juli 1959 erscheinen:

Die Amitose der tierischen und menschlichen Zelle

Von Professor **Dr. Otto Bucher**

Histologisch-Embryologisches Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Lausanne (Schweiz)
Mit 66 Textabbildungen. Etwa 180 Seiten. Gr.-8°. 1959. (Band VI/E/1.)

Vorbestellpreis, gültig bis zum Erscheinen S 288.—, DM 48.—, sfr. 49.10, \$ 11.45

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen S 360.—, DM 60.—, sfr. 61.40, \$ 14.30

Inhaltsübersicht: Vorwort. — Einleitung. — Zur Geschichte der Amitose. — Begriff der Amitose (Definition, Nomenklatur). — Gibt es überhaupt eine Amitose? Lebendbeobachtungen von Amitosen. — Amitosendiagnose im fixierten Präparat (Fehlerquellen und Irrtümer; Indizienbeweis für die amitotische Kernteilung). — Pseudoamitosen. — Kernpolymorphismus; Kernknospung, -lappung, und -fragmentierung. — Meroamitose, Karyonomie, Endocytogenese. — Verlauf der Amitose. — Teilungsdauer und Teilungsursachen. — Resultat der Amitose. (Größe der Tochterkerne. Chromosomenverhältnisse. Amitotische Kern- oder auch Zellteilung? Über die Entstehung zwei- und mehrkerniger Zellen.) — Unter welchen Bedingungen treten Amitosen auf? Hinweise auf die funktionelle Bedeutung der Amitose. (Zellarbeit [Stoffwechselaktivität] und Differenzierungsgrad. Ungünstige Lebensbedingungen und Alter. Wachstum und Regeneration. Rhythmisches Kernwachstum und Endomitose. Zur Bedeutung der Amitose.) — In welchen Geweben und Organen sind Amitosen beschrieben worden? — Vermutungen über das weitere Schicksal der Amitosen. — Schlusswort. — Literatur. — *Namensverzeichnis.*

Protoplasmic Streaming

By Professor **Noburô Kamiya**

Department of Biology, Faculty of Sciences, Osaka University, Japan

With 82 figures. Approx. 210 pages. Gr.-8°. 1959. (Band VIII/3/a.)

Vorbestellpreis, gültig bis zum Erscheinen S 321.60, DM 53.60, sfr. 54.90, \$ 12.75

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen S 402.—, DM 67.—, sfr. 68.90, \$ 15.95

Contents: Introduction. — Types of Streaming (General survey, Change in streaming type). — Rate and Intensity (Intracellular velocity distribution, Rate, course and direction of rotational streaming, Transport volume and intensity of flow). — Motive Force Responsible for the Protoplasmic Streaming (Motive force of the rotational streaming, Motive force of the protoplasmic streaming in myxomycete plasmodium). — Rhythmicity (Rhythm of motive force generation in the plasmodium, Rhythmicity of the protoplasmic motion other than that of the slime mould). — Energetics of Protoplasmic Streaming (Oxygen tension, Metabolic inhibitors, The role of ATP in the protoplasmic flow, Availability of ATP). — Influences of External Factors (Temperature, Light, Ultraviolet ray and other radiations, Osmotic pressure, Plasmolysis, Hydrostatic pressure, Mechanical pressure, Gravity, Centrifugal force, Electric current, Action current, Magnetic field, Hydrogen ions, Carbon dioxide, Salts, Auxins, Fat solvents, Miscellaneous substances). — Biology and Function of Protoplasmic Streaming (Inducement of protoplasmic streaming, Transport of substances, Locomotion, Correlation with some physiological activities and seasonal variations). — Experimental Approaches to the Mechanism of Protoplasmic Streaming (Seat of the motive force in rotational streaming, Streaming caused passively by difference in internal pressure, Protoplasmic motion in an isolated protoplasmic fragment, Moving fibrils in protoplasm, The phenomenon of shifting occurring in the plasmodium, Causal relation between potential difference and the motive force of the protoplasmic streaming, The mechanochemical system of the protoplasmic streaming). — Theories (Rotational streaming, Streaming in transvascular protoplasmic strand, Theories on the streaming in myxomycete plasmodium, Independent motion of protoplasmic particles). — Concluding Remarks. — Acknowledgements. — Bibliography.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

